

A nem izominvazív húgyhólyagrák prognosztikai faktorainak vizsgálata fluoreszcens *in situ* hibridizációval

Doktori értekezés

Dr. Kocsmár Ildikó

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lotz Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Krencz Ildikó, Ph.D., klinikai szakorvos
Dr. Küronya Zsófia, Ph.D., adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Sótonyi Péter, az MTA tagja, professor emeritus

Tagok: Dr. Kovalszky Ilona, az MTA doktora, professor emerita
Dr. Rácz Gergely, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2023

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
I. BEVEZETÉS	6
I./1. A húgyhólyagrák	6
I./1.1. A húgyhólyagrák epidemiológiája.....	7
I./1.2. Rizikófaktorok	7
I./1.2. A húgyhólyagrák diagnózisa.....	8
I./1.3. A húgyhólyagrák szövettani grade szerinti beosztása	10
I./1.4. A nem izominvazív húgyhólyagrák kezelése	11
I./2. A húgyhólyagrák rizikóstratifikációja.....	13
I./2.1. A prognosztikai modellek értékelése és a rizikótáblák alkalmazása a klinikai gyakorlatban.....	14
I./2.2. Az EORTC és a módosított EORTC rizikóbecslő rendszer	15
I./2.3. Az EAU rizikóbecslő rendszer	16
I./2.4. A CUETO rizikóbecslő rendszer	18
I./2.5. Az AUA rizikóbecslő rendszer.....	18
I./3. A húgyhólyagrák patofiziológiája	19
I./2. Aneuploidia húgyhólyagrákban	22
II. CÉLKITŰZÉS.....	25
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	27
III./1. A 3-as, 7-es, 9-es és 17-es kromoszóma aneuploidia prognosztikai szerepének vizsgálata vizeletmintákon.....	27
III./1.1. Betegek és a minták szövettani feldolgozása - Beteganyag I.....	27
III./1.2. A UroVysion teszt protokollja	28
III./1.3. A UroVysion FISH rizikóskála létrehozása	29
III./1.4. Az NMIBC betegek prognózis szerinti kockázati csoportba sorolása a jelenlegi nemzetközi irányelvek szerint	34
III./1.5. Statisztikai analízis	34
III./2. A 17-es poliszómia, a HER2 státusz és a TP53 mutáció prognosztikai értékének vizsgálata szöveti mintákon	35
III./2.1. Betegek és a minták szövettani értékelése - Beteganyag II.....	35
III./2.2. Immunhisztokémiai vizsgálat	36
III./2.3. Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció	37
III./2.4. Statisztikai analízis	40
IV. EREDMÉNYEK	41

IV./1. A UroVysion FISH rizikóskála prognosztikai értékének vizsgálata	41
IV./1.1. A vizelet FISH és a szövettani vizsgálattal kapott eredmények összehasonlítása	50
IV./1.2. A UroVysion FISH rizikóskála és a citogenetikai eltérést mutató sejtek prognosztikai értéke	51
IV./1.3. A UroVysion FISH rizikóskála prognosztikai értékének összehasonlítása a nemzetközi irányelvek által ajánlott rizikóbecslő táblákkal	51
IV./1.4. A UroVysion FISH rizikóskála teljesítménye az izominvazív hólyagtumороk kimutatásában	52
IV./2. A 17-es kromoszóma poliszómia, a HER2 és a p53 státusz prognosztikai értékének vizsgálata	53
IV./2.1. A 17-es poliszómia, a HER2 fehérjeexpresszió és a <i>HER2</i> génamplifikáció vizsgálata	55
IV./2.2. A nem izominvazív hólyagrákok potenciális prognosztikai faktorai	61
IV./2.3. A 17-es kromoszóma poliszómia és a <i>HER2</i> amplifikáció hozzáadott értéke az EAU és az AUA rizikóbecslő tábláihoz	66
IV./2.4. A G2 tumorok molekuláris vizsgálattal történő újbóli osztályozásának hatása az EAU szerinti rizikóbecslésre	72
IV./2.5. A 17-es poliszómia/ <i>HER2</i> amplifikáció lehetséges alkalmazásai a diagnosztikai gyakorlatban nem izominvazív hólyagrákok rizikóstratifikációjának javítása érdekében	75
IV./2.6. A p53 fehérjeexpresszió összefüggése a 17-es kromoszóma poliszómia és <i>HER2</i> amplifikáció státusszal és a nem izominvazív hólyagrákok progressziójával	79
V. MEGBESZÉLÉS	82
VI. KÖVETKEZTETÉSEK	92
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	94
VIII. SUMMARY	95
IX. IRODALOMJEGYZÉK	96
X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	110
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	113

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACCN= Average Corrected Chromosome Number, átlagos korrigált kromoszómaszám

AJCC=American Joint Committee on Cancer

ASCO/CAP= American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists

AUC=ROC-görbe alatti terület

AUA/SUO= American Urological Association/ Society of Urologic Oncology, Amerikai Urológiai Társaság/ Urológiai Onkológiai Társaság

BCG=Bacillus Calmette-Guérin

Chr17=17-es kromoszóma

CEP=Centromere Enumeration Probe

CI=confidence interval, konfidencia-intervallum

CIN=kromoszómális instabilitás

CIS=carcinoma *in situ*

CUETO= Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico

DNS=dezoxiribonukleinsav

EAU=European Association of Urology, Európai Urológiai Társaság

EORTC= European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Európai Rákkutató és Terápiás Szervezet

FDA= Food and Drug Administration, USA Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala

FFPE=Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, formalinfixált, paraffinba ágyazott

FGFR3=fibroblaszt növekedési faktor receptor 3

FISH=fluorescence *in situ* hybridization, fluoreszcens *in situ* hibridizáció

G1=grade 1

G2=grade 2

G3=grade 3

GLOBOCAN=Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence

HE=hematoxin-eozin

HER2 (HER2/neu, ERBB2)=humán epidermális növekedési faktor receptor 2 gén

HER2=humán epidermális növekedési faktor receptor 2 fehérje

HG=high grade
ICM=automated image-based cytometry, automatizált képalapú citometria
IHC= immunhisztokémia
ISUP= International Society of Urological Pathology, Nemzetközi Urológiai Patológia Társaság
LG=low grade
MIBC=muscle invasive bladder cancer, izominvazív húgyhólyagrák
MSI= mikroszatellita-instabilitás
NICE=National Institute for Health and Care Excellence
NCCN=National Comprehensive Cancer Network
NMIBC=non-muscle invasive bladder cancer, nem izominvazív húgyhólyagrák
NPV= negatív prediktív érték
OR=Odds Ratio, esélyhányados
p53=a *TP53* gén által kódolt, a sejtciklust, a DNS hibajavítást és az apoptózist szabályozó fehérje („a genom őrzője”)
PFS=progression-free survival, progressziómentes túlélés
PI3K=foszfatidilinozitol 3-kináz
PPV= pozitív prediktív érték
PUNLMP= papillary urothelial neoplasm of low malignant potential, alacsony malignus potenciálú papilláris urothelialis neoplasia
RFS=recurrence-free survival, kiújulásmentes túlélés
RNS=ribonukleinsav
ROC=Receiver operating characteristic
STAG2=stromális antigén 2 gén
TP53=a sejtciklust szabályozó p53 fehérjét kódoló tumorszuppresszor gén
TTP=time to progression, progresszióig eltelt idő
TURBT=transurethral resection of bladder tumor, hólyagdaganat transzuretrális reszekciója
UFS=UroVysion FISH Score, UroVysion FISH rizikóskála
UICC=International Union Against Cancer
VI-RADS=Vesical Imaging-Reporting and Data System
WHO=World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet

I. BEVEZETÉS

I./1. A húgyhólyagrák

A húgyhólyagrák önmagában széles keretek között változó megjelenést mutató megbetegedésként jelenhet meg, a visszatérő, nem invazív daganatoktól a multimodális és agresszív kezelést igénylő invazív vagy előrehaladott stádiumú betegségig. A hólyagrák a húgyhólyag lumenét bélelő uroteliális, azaz tranzicionális sejtek karcinómája. Uroteliális karcinóma kialakulhat a hólyag, a felső húgyutak (vesemedence és húgyvezetékek) és a proximális húgycső uroteliális sejtjeiből, a hólyagrák az uroteliális karcinómák körülbelül 90-95%-át foglalja magában.¹ A húgyhólyagrások 95%-a uroteliális karcinóma, beleértve a divergens differenciációt mutató formákat (pl. uroteliális karcinóma laphám differenciációval, uroteliális karcinóma glanduláris differenciációval, uroteliális karcinóma trophoblastos differenciációval) és a korábban variánsoknak nevezett szövettani altípusokat (pl. mikropapilláris, „nested”, plazmacitoid), melyek legtöbbje rosszabb prognózissal bír, mint a magas szövettani grádussal bíró, nem izominvazív, tisztán uroteliális karcinóma.^{2,3}

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) ajánlásának megfelelően a húgyhólyagrásokat standardizált szövettani jellemzők alapján meghatározott differenciáltsági fokuk szerint alacsony és magas szövettani grade csoportokba soroljuk, míg a daganat stádiumát a hólyagfal mélységi inváziójának mértékeként határozzuk meg. Az urotélium réteg határát respektáló papilláris tumorok (Ta stádium) és a csupán lamina propria inváziót (T1 stádium) mutató daganatok a hólyagrák nem izominvazív (non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC) csoportjába tartoznak, ezen tumorok a húgyhólyagrások mintegy 70%-át teszik ki, 40 évesnél fiatalabb betegeknél ez az arány még magasabb.^{1,4,5} A *carcinoma in situ* (CIS) egy külön fenotípus, amely magas fokozatú (high grade), lapos, nem invazív elváltozásként határozható meg, különösen magas kiújulási és progressziós rátával.¹

A nem izominvazív tumoroknál agresszívebb biológiai viselkedést mutató, ennek következtében más kezelési stratégiát igénylő izominvazív hólyagrások (muscle invasive bladder cancer, MIBC) csoportjába tartoznak a hólyag detrusor izomzatát beszűrő (T2 stádium) vagy azon túl terjedő (T3 és T4 stádium) daganatok.⁶⁻⁸

A nem izominvazív hólyagrások recidíva hajlama magas és az esetek egy részében izominvazív tumorrá progrediálnak.⁹ A WHO 2016-os klasszifikációja már javasolja a T1 stádiummal bíró daganatok invázió szerinti további felosztását, azonban a T1 stádium alcsoportjainak optimális besorolási rendszere még meghatározásra vár.^{10,11}

I./1.1. A húgyhólyagrák epidemiológiája

A húgyhólyagrák a 10. leggyakrabban diagnosztizált rosszindulatú tumor és a második leggyakoribb urológiai malignitás, világszerte több mint 1,6 millióan élnek a betegséggel.¹²⁻¹⁴ A hólyagrák élethosszig tartó kockázata férfiaknál körülbelül 1,1%, míg a nőknél kb. 0,27%.¹³ Az életkor szerint standardizált incidencia (100 000 személyévre vetítve) világszerte 9,5 a férfiak és 2,4 a nők esetében, míg az Európai Unióban 20 a férfiak és 4,6 a nők esetében.¹² A nyugati társadalmakban magasabb előfordulási gyakoriságról számolnak be, ami nagyrészt a rákkeltő anyagoknak való kitettségnek tudható be.¹⁵ Világszerte a hólyagrák életkorra standardizált halálozási aránya (100 000 személyévre vetítve) 3,3 volt a férfiak, míg 0,86 a nők esetében.¹² Évente körülbelül 549000 új eset kerül felfedezésre, és körülbelül 200000 haláleset tulajdonítható ezen betegségnek.¹⁴

I./1.2. Rizikófaktorok

Az előrehaladott életkor a hólyagrák legnagyobb kockázati tényezője, a diagnóziskor a páciensek átlagos életkora 70 és 84 év között van.¹⁶ Az előrehaladott életkor szerepét a rákkeltő anyagoknak, például a dohányfüstnek és ritkábban a benzolos vegyi anyagoknak és az aromás aminoknak való kitettséggel magyarázzák, kiegészítve a DNS-javító képesség életkorral összefüggő csökkenésével.¹⁷ A másik legfontosabb, egyben befolyásolható rizikófaktor a dohányzás, ami az esetek körülbelül feléért tehető felelőssé, azonban általánosságban 20-30 év telik el a cigarettaexpozió és a diagnózis

felállítása között.¹⁸⁻²⁰ A hólyagrák előfordulása jelenleg - bár nem egységesen - azokban a régiókban a legmagasabb, ahol az 1980-as években magas volt a dohányzás aránya.^{8,14,21}

A krónikus gyulladással járó állapotok fokozott regenerációt és sejtproliferációt eredményeznek, ami hajlamosít az uroteliális malignitás kialakulására. Ilyen például a bakteriális és az Észak-Afrikában különösen gyakori *Schistosoma haematobium* fertőzés, a hosszú időn keresztül alkalmazott hólyagkatéter és a korábbi hólyagaugmentáció.^{22,23}

A hólyagrák rizikójának növekedéséért felelős lehet a foglalkozási expozíció gyakoriságának növekedése is. Ismert, hogy hólyagrák keltőek az aromás aminok, így pl. a benzolfestékek, de számos egyéb vegyi anyag gyártása vagy foglalkozási alkalmazása (pl. fém-, gumi-, textilipar, festők, nyomdászok, fodrászok stb. körében), valamint az ivóvízben lévő arzénnek való kitettség is növeli a hólyagrák kockázatát, az ivóvíz klórozása és a trihalometánok későbbi szintje pedig potenciálisan rákkeltő lehet.^{1,15,24}

A prosztata- vagy méhnyakrák kezelésének részeként alkalmazott kismedencei besugárzás is növeli a hólyagrák kialakulásának kockázatát.^{25,26} Kimutatták, hogy a hólyagrák előfordulásának férfi túlsúlya (férfiakban 3-4-szer gyakoribb a hólyagrák) az expozíciós kockázatok nemi különbségeitől függetlenül is fennáll.²⁷ Ebben szerepe lehet a prosztata megnagyobbodás következtében fellépő vizeletretenciónak a vizeletben lévő rákkeltő anyagok pangása által.¹ Továbbá a rákkeltő anyagok májenzimek általi eltérő metabolizmusa a férfiak és a nők között az urotélium rákkeltő anyagokkal szembeni eltérő expozícióját eredményezi, ezen felül a nemi szteroid hormonok hatáskülönbségei is szerepet játszhatnak a hólyagrák férfiakban gyakoribb kialakulásában.²⁷

A genetikai hajlam az egyéb kockázati tényezőkre való fogékonyságra gyakorolt hatásán keresztül befolyásolja a hólyagrák előfordulását.^{12,28} A klinikailag jelentős csírvonal-variánsok a DNS-károsodást javító génekben gyakran fordulnak elő előrehaladott uroteliális rákban szenvedő betegeknél.²⁹

I./1.2. A húgyhólyagrák diagnózisa

A hólyagrák leggyakoribb megjelenési formája a látható hematuria, azonban jelentkezhet mikroszkópikus hematuria, irritatív ürítési tünetek képében vagy felismerésre kerülhet a hólyagdaganat képalkotó vizsgálat során véletlenül is.¹ Látható

vérvezelés esetében a hólyagrák prevalenciája 10-20% közé tehető, míg mikroszkópos hematuria esetében 3-5% között mozog.^{30,31} A hematuria legtöbb esetben nem jár fájdalommal, nem specifikus alsó húgyúti tünetek, mint sürgető vizelési inger, urge inkontinencia és dysuria különösen CIS esetében jellemzőek.³² A fájdalom és a következményes tünetek általában már csak a lokálisan előrehaladott esetekben jelentkeznek. A hematuria kivizsgálása magában foglalja a hólyag cisztoszkópos megtekintését és a felső húgyutak (azaz a vese, a vesemedence és az ureter) keresztmetszeti képalkotását (CT vagy MR urográfia).¹ A papilláris hólyagtumor diagnózisa végső soron a hólyag cisztoszkópos vizsgálatától és a mintát vett szövet szövettani értékelésétől függ, míg a CIS diagnózisa a cisztoszkópia, a vizeletcitológia és több hólyagbiopsziátum szövettani értékelésének kombinációjával történik.¹² A CIS léziók cisztoszkópia során történő detektálását segítheti a fluoreszcens cisztoszkópia és a szűkített hullámhosszú képalkotás (narrow band imaging).^{33,34} Az újonnan azonosított hólyagdaganatok endoszkópos reszekciója vagy a hólyagdaganat transzuretrális reszekciója (transurethral resection of bladder tumor, TURBT) diagnosztikus és potenciálisan terápiás célú.³⁵ Inkomplett reszekció, a detrusorizom hiánya a reszekátumban vagy magas kockázatú, Ta vagy T1 stádiumú betegség esetén 4-6 héten belül ismételt TURBT javasolt.¹

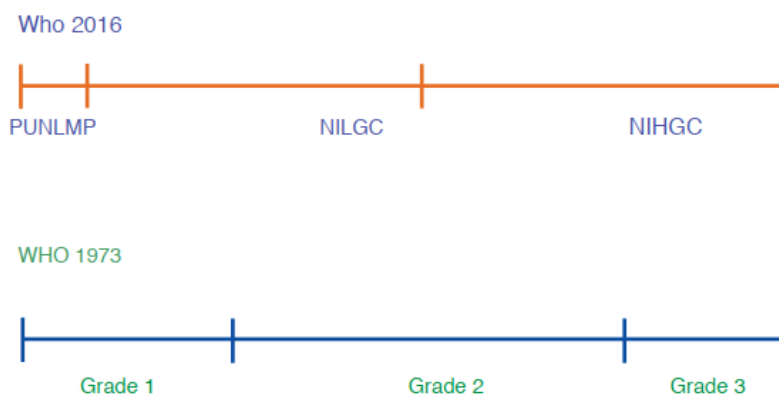
A multiparametrikus MRI vizsgálat során a VI-RADS (Vesical Imaging-Reporting and Data System) használható az izominvazív betegség azonosítására.³⁶ A VI-RADS score rendszer öt szinten értékeli a detrusor izom infiltrációját vagy az azon túli tumorinváziót. A VI-RADS 1-es és 2-es kategória az izominvazív tumor alacsony valószínűségét jelzi, a 3-as kategória nem jelzi egyértelműen az izominvazió jelenlétét, a 4-es kategória a tumor izominvazivitását valószínűsíti, míg az 5-ös kategória izominvazivitást vagy a hólyagfalon történő túlterjedést jelez.²

A vizeletcitológia hasznos eszköz egyrészt a hematuria értékelésére, másrészt a kezelést követően az utánkövetés során.¹ A vizsgálat előnye, hogy nagy érzékenységgel rendelkezik a high grade szövettani grádussal rendelkező tumorok felismerésében (beleértve a carcinoma *in situ*-t is), azonban a vizsgálat intravesicalis kezelés utáni értelmezése kihívást jelent.³⁷ Ezenkívül a vizsgálók közötti variabilitás jelentősen befolyásolhatja a vizeletcitológiai diagnosztikai kategóriák végső jelentését a párizsi munkacsoport által 2016-ban közzétett szabványosított értékelési rendszer ellenére.³⁸

Ennek leküzdésére számos citológiai vagy molekuláris markert vizsgáltak, melyek közül az USA Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) több vizelet biomarker diagnosztikai alkalmazását engedélyezte. Ezek hasznos kiegészítő eszközök lehetnek meghatározott betegcsoportoknál, de jelenleg még egyiket sem fogadták el a rutin klinikai gyakorlatban a diagnózis felállítására vagy nyomon követésére és egyik sem rendelkezik a cisztoszkópia helyettesítéséhez szükséges diagnosztikus pontossággal.^{35,38} A UroVysion (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) egy olyan citológiai alapú teszt, amely fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH) alkalmaz a húgyhólyagrakra jellegzetes kromoszómaszám eltéréssel és mutációval rendelkező sejtek kimutatására. Eredetileg a húgyhólyagrak kimutatására fejlesztették ki, de újabban már alkalmazzák BCG (Bacillus Calmette-Guérin)-refrakteritás előrejelzésére a nem izominvazív hólyagrak esetében.³⁹

I./1.3. A húgyhólyagrak szövettani grade szerinti beosztása

2004-ben a WHO és a Nemzetközi Urológiai Patológia Társaság (ISUP) közzétette az uroteliális karcinómák szövettani besorolását, majd 2016-ban megújította azt, amely a régebbi, 1973-as WHO-klasszifikációhoz képest más besorolást alkalmaz az egyes szövettani kategóriák között.⁴⁰ 2016-ban adták ki a WHO klasszifikáció harmadik kiadását, amely a 2004-ben javasolt változtatásokat emeli ki az 1973-as szövettani besoroláshoz képest.³²



1. ábra. A WHO 2016 és WHO 1973 szerinti uroteliális karcinóma szövettani grade beosztás összehasonlítása.

Rövidítések: WHO= Egészségügyi Világszervezet, PUNLMP= alacsony malignus potenciálú papilláris uroteliális neoplázia, NILGC= nem invazív low grade karcinóma, NIHGC= nem invazív high grade karcinóma

(Compérat EM, Burger M, Gontero P et al., *Eur Urol Focus*, 2019 nyomán) ⁴¹

A WHO 2016-os beosztása a WHO/ISUP 1998-as és 2004-es osztályozásán alapul (1. ábra).^{41,42} Az uroteliális tumorok alacsony grádusú (low grade, LG) és magas grádusú (high grade, HG) tumorokra való felosztása, ahogyan azt a WHO a 2004-es osztályozásában bevezette, továbbra is a WHO 2016-os rendszerének része, továbbá míg a pTa és pT1 stádiumú tumorok LG és HG osztályozásúak, minden izominvazív uroteliális karcinóma HG tumornak minősül.⁴¹ Egy nagy multicentrikus vizsgálat eredményei szerint összehasonlítva a WHO 2004/2016-os beosztással, a WHO 1973-as osztályozása erősebb prognosztikai tényezőnek bizonyult a TaT1 tumorok progressziójának előrejelzésére, azonban a két osztályozási rendszer négyfokozatú kombinációja ([LG]/G1, LG/ G2, HG/G2 és HG/G3) jobbnak bizonyult, mint bármelyik osztályozási rendszer önmagában.⁴³ Ebből kifolyólag ezek az eredmények nem támogatják a PUNLMP (papillary urothelial neoplasm of low malignant potential, alacsony malignus potenciálú papilláris uroteliális neoplázia) külön fokozatú kategóriaként való további használatát a WHO 2004/2016-os rendszerében.¹² További eredmények igazolták, hogy a háromszintű 1973-as és a kétszintű 2004/2016-os WHO osztályozási rendszer sem optimális. Egy szisztematikus szakirodalmi áttekintésben azt találták, hogy a 2004/2016-os WHO osztályozásban az egy vizsgálón belüli és a vizsgálok közötti variabilitás valamivel kisebb, de még mindig túl magas, és nem sikerült megerősíteni, hogy a 2004/2016-os WHO-osztályozás felülmúlja az 1973-as osztályozást a kiújulás és a progresszió kockázatának előrejelzésében.⁴⁴ Mivel mindkettő bír prognosztikai jelentőséggel, a jelenlegi EAU-irányelvek javasolják mind a WHO 1973-as, mind a WHO 2004/2016-os szövettani grade besorolás használatát. ⁴⁵

I./1.4. A nem izominvazív húgyhólyagrák kezelése

Az alacsony kockázatú betegségben szenvedő, teljes kezdeti reszekción átesett betegeket cisztoszkópos megfigyeléssel szükséges követni, míg a high grade szövettanal

rendelkező, Ta vagy T1 stádiumú betegségben szenvedő betegeket ismételt reszekciónak kell alávetni.^{12,35} Intravezikális kemoterápiát szükséges adni a betegeknek közvetlenül a papilláris elváltozás transzuretrális reszekciója után, amennyiben a műtét során nem áll fenn a húgyhólyag perforációjának vagy izominvazív tumor jelenlétének klinikai gyanúja.¹² A tumorsejtek beágyazódásának megelőzését a TURBT műtét utáni első néhány órán belül meg kell kezdeni.⁴⁶ Alacsony vagy közepes kockázatú betegség gyanúja esetén a műtétet követő 24 órán belül egyszeri adag intravezikális kemoterápia adható be a szabadon lebegő tumorsejtek elpusztítása, implantálódásuk megakadályozása és ezáltal az uroteliális léziók elszaporodásának mérséklése végett.¹ Kimutatták, hogy a TURBT műtét utáni azonnali egyszeri hólyaginstilláció a keringő, vagy lebegő tumorsejtek elpusztításával, valamint a reszekció helyén maradó tumorsejtekre és a kis kiterjedésű, nehezen vizualizálható tumorokra gyakorolt ablatív hatás révén hat.^{47,48} A mitomicin C-vel, epirubicinnel vagy pirarubicinnel végzett egyszeri instilláció során mind kedvező hatás érhető el.⁴⁹ A mitomicin C régóta alkalmazott szer, azonban alkalmazása során irritatív ürítési tünetek és ritkán hólyagnekrózis léphet fel.⁵⁰ Az alacsony kockázatú daganatos betegeknél az egyszeri instilláció csökkenti a kiújulás kockázatát, és standard és teljes körű kezelésnek tekinthető, más betegek esetében azonban továbbra is elégtelen önmagában ez a kezelés, mivel esetükben a kiújulás és a progresszió valószínűsége jelentős.^{12,49,51} A további adjuváns intravezikális terápia szükségessége a betegség prognózisától függ.¹² Közepes és különösen a magas kockázatú betegségben szenvedő betegeknél adjuváns intravesicalis kezelés javasolt. A Bacillus Calmette-Guérin (BCG) terápia, az elsősorban tuberkulózis ellen alkalmazott vakcina, több randomizált kontrollált vizsgálat és metaanalízis szerint hatékonyabb, mint a kemoterápia, mivel immunmoduláns hatású és erősíti a daganatok ellen is aktív sejtes immunitást, ezáltal csökkentheti a hólyagrák kiújulását és késleltetheti a progresszióját.^{52,53} Az indukciós BCG-injekciókat 6 hetes ütemterv szerint szükséges alkalmazni.⁵⁴ Az optimális hatékonyság érdekében az indukciós kúrát fenntartó injekcióknak kell követniük.^{52,55–57} Azok a betegek, akiknél a megfelelő BCG kezelést követően a betegség tartósan fennáll vagy súlyosbodik, valamint azok, akiknél a fenntartó kezelés alatt a betegség kiújul, BCG-refrakternek minősülnek.⁵⁸ A BCG terápia kudarca azon betegeknél is előfordulhat, akiknél a nem megfelelő kezelési kúra mellett a betegség kiújulása nem tolerálható mellékhatások miatt következik be.⁵⁸ Ezeknek a betegeknek az

onkológiailag leghatékonyabb kezelés a radikális cisztektómia, bár megfontolhatók különböző hólyagmegőrzési stratégiák is, beleértve az intravezikális kemoterápiát, az eszközzel támogatott intravezikális kezelést és különböző klinikai vizsgálatokba történő bevonást.⁵⁹

I./2. A húgyhólyagrak rizikóstratifikációja

A nem izominvazív húgyhólyagrakok egy része a követés során izominvazív tumorrá progrediál, így ezen tumorok rizikóbesorolása nagy jelentőséggel bír a megfelelő betegkövetési stratégia és a terápia megválasztása szempontjából. A különböző nemzetközi irányelvek klinikopatológiai faktorokon alapuló rizikótáblákat javasolnak a nem izominvazív húgyhólyagrakok rizikóstratifikációjára. Az Európai Urológiai Társaság (EAU), amelynek iránymutatásait több mint 50 urológiai társaság és egyesület támogatta, a betegek alacsony, közepes és magas kockázatú csoportba sorolását javasolja, a magas kockázatú csoport magában foglalja a legmagasabb kockázatú daganatok alsocsoportját.^{45,60} Bár az exofitikus nem izominvazív hólyagtumorok a transzuretrális reszekció során teljes mértékben eradikálhatóak, a kiújulási arány a hosszú távú követés során akár 80% is lehet, így a leghatékonyabb kezelés és a követés gyakoriságának meghatározása érdekében a kockázatalapú terápias megközelítés ajánlott, miközben minden beteg esetében a lehető legmagasabb életminőség fenntartására kell törekedni.^{9,60,61} Általános elv, hogy a kezelésnek figyelembe kell vennie a betegség prognózisát, így a tumor kiújulásának és/vagy progressziójának kockázatának előrejelzésére számos, meghatározott betegpopulációra vonatkozó prognosztikai modell került bevezetésre.⁶⁰ Az EAU, az Amerikai Urológiai Társaság (AUA)/Urológiai Onkológiai Társaság (SUO) és az angliai National Institute for Health and Care Excellence (NICE) mind a betegek prognosztikai kockázati csoportokba sorolását javasolja, míg az Egyesült Államokbeli National Comprehensive Cancer Network (NCCN) a betegek patológiai stádium és szövettani grádus alapján történő csoportosítását alkalmazza.⁶¹ A szövettani lelet és a beteg kórtörténete határozza meg, hogy a beteg az alacsony, közepes és magas kockázati csoport közül melyikbe sorolható. A kis, szoliter,

primer, alacsony szövettani grádusú pTa tumorok az alacsony kockázati csoportba tartoznak, mivel esetükben nagyon alacsony a kockázata az invazív hólyagrakká való progresszióknak és 20-30%-os ötéves kiújulási rátával rendelkeznek. A magas kockázatú daganatok a T1 stádiumú vagy magas grádusú daganatok (beleértve az EAU szerint az összes Ta tumort, de az AUA-SUO iránymutatások szerint csak a 3 cm-nél nagyobbakat), illetve a carcinoma *in situ*, mivel esetükben az 5 éven belüli kiújulás kockázata több mint 50%, a progresszió kockázata pedig 20% az 1-3 éves fenntartó BCG kezelés ellenére.^{2,62} A közepes kockázatú daganatok esetében, amelyek általában olyan daganatoknak tekinthetők, amelyek nem tartoznak sem az alacsony, sem a magas kockázatú kategóriába, a kiújulási arány 40-50% 5 év alatt, és a progresszió kockázata 5-10% közötti.²

I./2.1. A prognosztikai modellek értékelése és a rizikótáblák alkalmazása a klinikai gyakorlatban

A prognosztikai modellek diszkriminációját általában a Harrell-féle torzítás korrigált C konkordanciaindexszel értékelik, amely azon betegpárok százalékos arányát mutatja, amelyekben az előre jelzett és a megfigyelt kimenetek megegyeznek, vagyis annak valószínűségét, hogy két véletlenszerűen kiválasztott beteg közül annál a betegnél, akinél az esemény először következett be, a modell szerint ezen esemény nagyobb valószínűséggel következik be. A modell értékelése szerint ha a C-index 0,5, akkor nincs diszkrimináció (véletlen egyezés), ha pedig 1, akkor tökéletes egyezéssel történő diszkrimináció áll fenn.⁶³⁻⁶⁵

A legtöbb prognosztikai modell a klinikopatológiai tumorjellemzőkön alapul, azonban a kapott kezelés szintén befolyásolhatja a betegség lefolyását, ezért a vizsgált populáció kiválasztása nagy jelentőséggel bír.^{66,67} Ideális esetben rizikófaktorok vizsgálatánál a vizsgált populáción belül minden beteget az aktuális irányelvek szerint kell kezelni, hogy a következtetések relevánsak legyenek.⁶¹ Az összes rendelkezésre álló rizikóbecslő modell egyik leglényegesebb limitációja, hogy olyan populációkon alapulnak, amelyeket a jelenlegi szabványtól eltérően kezeltek.⁶¹ A betegség kezelésében bekövetkezett változások, mint például az utóreszekció; az egyszeri, azonnali,

posztoperatív intravezikális kemoterápiás instilláció és a BCG kezelés mind javíthatják a betegség prognózisát, ami hozzájárulhat ahhoz, hogy a jelenleg alkalmazott rizikóbecslő modellek a jelenlegi irányelvek szerint kezelt betegeknel túlbecsülik a kiújulás és a progresszió kockázatát.^{60,61} Annak ellenére, hogy mind az Európai Rákkutató és Terápiás Szervezet (EORTC), mind a Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico (CUETO) kockázatbecslő rendszerek, amelyeken a jelenlegi WHO 1973-as EAU kockázatmeghatározó csoportok alapját képezik, pontosan meg tudják jósolni, hogy mely betegek esetében nem történik meg az izominvazív tumorra történő progresszió, egyik pontozási rendszer sem tudja pontosan meghatározni, hogy mely betegek esetében fog a betegség progrediálni.⁶⁸ Az EAU jelenleg érvényben lévő irányelve szerint a nem izominvazív hólyagrákos eseteket a négy kockázati csoport valamelyikébe kell besorolni. A beteg rizikócsoportja a www.nmibc.net oldalon elérhető EAU rizikócsoport kalkulátor segítségével határozható meg. Az EORTC 2006-os pontozási modellje használandó a BCG-vel nem kezelt egyéni betegeknel a tumor kiújulásának kockázatának előrejelzésére a www.omnicalculator.com/health/eortc-bladder-cancer oldalon. A 2016-os EORTC vagy a CUETO kockázati pontozási modell használandó a daganat kiújulás és progresszió kockázatának előrejelzésére a BCG intravezikális immunterápiával kezelt betegeknel (a 2016-os EORTC-modell 1-3 éves fenntartási időre, a CUETO-modell pedig 5-6 hónap BCG terápiára van kiszámítva).⁶⁰

I./2.2. Az EORTC és a módosított EORTC rizikóbecslő rendszer

Az EORTC pontozási rendszerét és kockázatbecslő táblázatait 2006-ban tették közzé, és jelenleg ez a legszélesebb körben használt és validált előrejelzési modell nem izominvazív hólyagrákban. E modell segítségével kiszámítható a kiújulás és a progresszió egyéni valószínűsége 1 és 5 év múlva. A klinikopatológiai tényezők prognosztikai értékét az 1979 januárja és 1989 szeptembere között hét tanulmányban randomizált betegek csoportjánál elemezték. Összesen 2596 alkalmas beteget vontak be az elemzésbe, és a medián követési idő 3,9 év volt.⁶¹ Az EORTC 2006-os pontozási modellje a hat legjelentősebb klinikopatológiai tényezőn alapul a főként intravezikális kemoterápiával kezelt betegek esetében, amelyek a daganatok száma, a tumor átmérője, a korábbi kiújulási arány, a T stádium, CIS egyidejű jelenléte és a WHO 1973-as szövettani grade, melyek közül a legjelentősebbek a T stádium, a szövettani grade és CIS jelenléte.^{61,66} A

C-index a tumor kiújulására vonatkozóan 1 és 5 év múlva egyaránt 0,66 volt, a tumor progressziójára vonatkozóan pedig 0,74 volt 1 év múlva és 0,75 5 év múlva.⁶¹ Sylvester és munkatársai hangsúlyozták, hogy az elemzésbe bevont betegek többségét kemoterápiával kezelték, és csak 171 beteget kezeltek BCG-vel, azonban őket is fenntartó terápia nélkül, amit ma a magas kockázatú betegek esetében a nemzetközi irányelv javasol, továbbá a magas kockázatú betegeknél rutinszerűen nem végeztek utóreszekciót.⁶⁶ [7] Mindezek az eltérések a vizsgált populáció és a jelen irányelvek szerint kezelt betegek között hozzájárulhatnak a rizikó túlbecsléséhez, főleg a magas kockázatú, nem izominvazív hólyagtumoros betegek esetében.^{61,63} A BCG kezelés szempontjából való eltérések megoldására külön EORTC kockázati csoportokat és nomogramokat dolgoztak ki a CIS nélküli, közepes és magas kockázatú daganattal rendelkező, BCG-vel kezelt betegek számára.⁶² Ezen nomogramok kifejlesztése során Cambier és munkatársai két EORTC randomizált vizsgálat 1812 betegét elemezték, amelyekben a közepes és magas kockázatú, CIS nélküli NMIBC betegek indukciós BCG terápiát és 1-3 év fenntartó BCG kezelést kaptak.⁶²

I./2.3. Az EAU rizikóbecslő rendszer

A kockázati csoportba sorolás, a kezelés és a nyomon követési ajánlások megkönnyítése érdekében az EORTC progresszióra vonatkozó kockázati pontszámán alapuló egyszerűsített kockázati csoportba sorolás került bevezetésre 2013-ban.⁶¹ Az EAU rizikócsoportokat az EORTC rizikótáblázatai alapján alakították ki, amelyek kialakítása során az 1973-as WHO szövettani grade besorolást használták, és az 1980-as években diagnosztizált és kezelt betegeket vonták be.⁴⁵ Az EAU-kategóriák a kezelési döntéshozatal alternatív eszközének tekinthetők.⁶⁹ Az egyszerűsített rizikócsoportok létrehozásának oka az volt, hogy az EORTC-pontszámot külön számították ki a betegség kiújulása, illetve progressziója szempontjából, míg az EAU-osztályozás egyetlen általános kockázati csoportba sorolta a betegeket. Ennek következtében viszont az eredeti EAU-kategóriák alkalmazása végül nem vezetett a kezelési ajánlások megváltoztatásához azon esetekben, ahol a kiújulás vagy progresszió kockázatának növekedése magasabb csoportba sorolást eredményezett az EORTC-hez képest.⁶¹ Ezért transzuretrális reszekcióval és bizonyos esetekben további intravezikális kemoterápiával kezelt primer tumoros betegek egyéni betegadatai kerültek felhasználásra új EAU prognosztikai

rizikócsoporthoz, melyek magukba foglalják mind a WHO 1973, mind a WHO 2004/2016-os szövettani grade osztályozási rendszereket.⁶⁰ Ez a tanulmány frissített EAU-prognosztikai kockázati csoportokat biztosít, amelyek felhasználhatók a betegek kezelésének és nyomon követésének meghatározására.⁴⁵ A WHO 2004/2016-os és 1973-as besorolási osztályozásának beépítésével egy új, nagyon magas rizikójú csoport került azonosításra, amely esetében az urológusoknak azonnal értékelniük kell és szükség esetén módosítaniuk kell terápiás stratégiájukat.⁴⁵ A többváltozós elemzés szerint a tumor stádiuma, a WHO 1973-as fokozat, a WHO 2004/2016-os fokozat, az egyidejűleg fennálló CIS, a tumorok száma, a tumor mérete és az életkor voltak a betegség progressziójának független előrejelzői.⁴⁵ A kezelési ajánlások alkalmazásának lehetővé tétele érdekében a betegek kockázati csoportokba sorolása javasolt aszerint, hogy mekkora a valószínűsége az izominvazív betegség kialakulásának.⁶⁰ A legfontosabb klinikai kérdés annak meghatározása, hogy mely T1G3/HG betegek fognak progrediálni az "optimális" diagnózis, kezelés és követés ellenére, ezért az EAU irányelvei meghatározták a nem izominvazív hólyagtumoros betegek azon csoportját, akiknél a legnagyobb a daganat progressziójának kockázata, és esetükben a BCG-vel történő konzervatív kezelés helyett korai vagy azonnali radikális cisztektómiát javasolnak.⁶¹ Az új WHO 2004/2016-os és 1973-as nagyon magas kockázatú csoportokban, amelyek a bevont betegek 2-3%-át teszik ki, a progresszió valószínűsége 5 év alatt a jelenlegi magas kockázatú EAU-csoport 12%-áról 40%-ra, illetve 44%-ra nőtt.⁴⁵ Ezen adatokból is látszik, hogy alapvető fontosságú a nagyon nagy kockázatú betegek ezen kis alcsoportjának pontos azonosítása, hogy komolyan fontolóra lehessen venni az azonnali cisztektómia lehetőségét.⁴⁵ Bár a magas kockázatú NMIBC-betegek további prognosztikai tényezőkkel történő kategorizálását alátámasztó adatok még mindig korlátozottak, a következő kedvezőtlen prognosztikai tényezők további információt nyújthatnak a döntéshozatali folyamatban: női nem, CIS a prosztatata húgycsővében férfiaknál, T1G3 daganatok a húgyhólyag (pseudo)divertikulumában, a daganat stádiuma a hólyag második transzuretrális reszekciójának időpontjában, nyirokér-invazió és az uroteliális karcinóma variáns szövettani változata.^{3,61,70-73} Mivel a 2021-es EAU NMIBC pontozási modell a tumor progressziójának kockázatát határozza meg, azonban a kiújulás kockázatát nem, a jelenleg érvényben lévő EAU irányelv szerint az EORTC, a módosított EORTC, a CUETO, illetve a kemoterápiával kezelt Ta G1/G2 tumorok

rizikóstratifikálására kifejlesztett modellek bármelyike használható a betegségkiújulás kockázatának kiszámítására.^{60,62,66,67,74}

I./2.4. A CUETO rizikóbecslő rendszer

A BCG-vel kezelt NMIBC betegek egy alcsoportjában a CUETO pontozási modell pontosabb, mint az EORTC kockázati táblázatai.⁶¹ A pontozási rendszer hét prognosztikai tényező értékelésén alapul: nem, életkor, korábbi kiújulási státusz, tumorok száma, T kategória, társult CIS és WHO 1973 szövettani grade.⁶⁰ A CUETO modell 1062, közepes és magas kockázatú nem izominvazív hólyagrákban szenvedő beteg adatain alapul, akiket négy, különböző intravezikális BCG kezelések összehasonlítását végző Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico (CUETO) vizsgálatba vontak be.⁶¹ Ez a modell használható a kiújulás és a progresszió valószínűségének becslésére olyan esetekben, ahol az adjuváns intravezikális BCG-vel a jelenlegi EAU ajánlásnál rövidebben kezelt betegek kockázatbesorolását kell elvégezni.⁶¹ A modell alkalmazásával a kiújulás számított kockázata alacsonyabb, mint az EORTC-modell segítségével kapott érték, azonban a progresszió valószínűsége csak a magas kockázatú betegek esetében alacsonyabb, amely jelen vizsgálatban a BCG alkalmazásának tudható be.⁶⁷

I./2.5. Az AUA rizikóbecslő rendszer

A klinikai döntéshozatal standardizálása és egyszerűsítése érdekében az AUA/SUO kockázati osztályozási rendszer a betegeket a kiújulás és a progresszió alacsony, közepes és magas kockázata szerint osztályozza, a fokozat, a stádium, a tumor mérete, a multifokáltság, a szövettani variáns, a nyirokérinvázió és a korábbi terápia alapján.³⁵ Az AUA modellben egyedülálló, hogy a szoliter Ta HG 3 cm-es vagy annál kisebb tumorok közepes kockázatúnak minősülnek annak ellenére, hogy a HG tumorok potenciálisan hajlamosak a progresszióra.⁷⁵ További kisebb különbségek is találhatók az új EAU modell és az AUA modell között. Ilyenek, hogy az AUA modell kifejezetten figyelembe veszi a betegség kiújulását is, kivéve az AUA magas kockázati csoportját, amely utóbbi viszont magában foglalja a BCG refrakteritást a HG betegeknél és a potenciálisan heterogén prognózisú betegeket, amelyeket az EAU két külön (magas és nagyon magas) kockázati csoportra osztott.⁴⁵ Bár az AUA modell hasonló az EORTC

modellhez, ebben az esetben is számos különbség figyelhető meg. Azon túlmenően, hogy az AUA/SUO kockázati csoportok a kisebb szoliter HG Ta tumorokat közepes kockázatú elváltozásnak minősítik, az AUA/SUO modell magában foglalja a korábbi intravezikális terápiát és magas kockázatúnak minősíti a BCG terápiát követően kiújuló HG szövettannal rendelkező betegeket, valamint azokat, akiknél nyirokérinvaszió, variáns szövettan vagy a prosztata húgycső érintettsége áll fenn.⁷⁵ Ritch és munkatársainak elemzése kimutatta, hogy az AUA/SUO modell az EORTC és a CUETO modellhez hasonlóan szerény előrejelző képességgel rendelkezik a kiújulás és a progresszió tekintetében.⁷⁵ Meg kell jegyezni, hogy bár vannak hasonlóságok az AUA, az EORTC és a CUETO modelljei között, az AUA/SUO kockázati csoportok egy testület konszenzusát képviselik, és nem metaanalízisen vagy prospektív vizsgálatokon alapulnak.^{35,60,66}

I./3. A húgyhólyagrák patofiziológiája

A húgyhólyagrák patofiziológiájának aktuális modellje szövettani és molekuláris megfigyeléseken alapul.⁷⁶ Az egérmodellekből és humán mintákból származó patológiai és klinikai információk azt mutatják, hogy az uroteliális karcinóma két különböző úton fejlődik, melyek során papilláris nem izominvazív hólyagtumorok és nem papilláris (szolid) izominvazív hólyagtumorok keletkeznek.³² A szövettanilag felismerhető uroteliális elváltozások kialakulását az urothéliumon belül az elváltozott sejtek klonális terjeszkedése előzi meg.⁷⁶ A low grade papilláris tumorok egyszerű hiperplázia és alacsony fokú diszplázia útján keletkezhetnek, és molekuláris szinten a 9-es kromoszóma deléciói, továbbá a fibroblaszt növekedési faktor receptor 3 (*FGFR3*), a *PIK3CA* és a stromális antigén 2 (*STAG2*) gének aktiváló mutációi jellemzik őket.⁷⁶ Mindezek a gének a sejtek proliferációjában, osztódásában és növekedésében játszanak szerepet.³² Ezek a nem invazív tumorok gyakran kiújulnak, de genetikailag stabilak.⁷⁶ A nem izominvazív húgyhólyagrágoknál az esetek 18%-ában figyelhető meg az *FGFR3* gén genetikai alterációja, ami többnyire a luminális papilláris molekuláris altípushoz társul, amely a betegség szempontjából kedvező kimenetelt jelent.⁷⁷ Az uroteliális papillóma, amely jóindulatú daganatnak számít, szintén gyakran mutat *FGFR3* mutációkat.⁷⁸ Emberekben

az NMIBC előre jelzett prekursorai lapos vagy papilláris uroteliális hiperplastikus elváltozások.³² Ehhez hasonlóan egérmódellekben a mutáns HRAS alacsony szintű expressziója lapos vagy papilláris uroteliális hiperplastikus elváltozásokat eredményez, míg a magas szintű expresszió nem izominvazív húgyhólyagrákhoz vezet.⁷⁹ Az NMIBC két gyakori elváltozása, a 9-es kromoszóma deléciója és az *FGFR3* pontmutációja szintén kimutatható ezekben a hiperplastikus prekursorokban, továbbá, amikor ugyanazon beteg papilláris nem izominvazív hólyagtumorának vizsgálatára került sor, ezek az elváltozások a prekursorban és tumorban közösek voltak, ami a prekursor és a tumor közötti klonális kapcsolatra utal.⁸⁰⁻⁸²

Az izominvazív hólyagrák többnyire feltehetően a lapos diszplázia és carcinoma *in situ* (CIS) révén jön létre, melyek a 9-es kromoszóma deléciói mellett gyakran *TP53*-mutációt is mutatnak, azonban *FGFR3*-mutációt nem.⁷⁶ Az invazív tumorokban genetikai instabilitásuk miatt számos genomális elváltozás halmozódik fel.⁷⁶ A low grade papilláris nem izominvazív tumorok a *CDKN2A* elvesztése következtében izominvazív tumorrá progrediálhatnak.³² Egérmódellekben is igazolták, hogy az izominvazív hólyagtumorok prekursorai a lapos uroteliális diszplázia és carcinoma *in situ* (CIS).³² Továbbá a nem izominvazív tumorokkal szemben a szolid izominvazív hólyagtumorok egérmódellekben történő létrehozásához egy vagy több tumorszupresszor gén, mint a *Trp53* (a *TP53* egér analógja), az *Rb1* és a *Pten* inaktiválása szükséges.⁸³⁻⁸⁵ Ezen eredményekkel összhangban, emberekben jól dokumentált a MIBC kialakulásának magas kockázata a diszpláziás vagy CIS-es betegeknél, és ezen léziók elváltozásai közösek a high grade és invazív hólyagrágok jellemzőivel.^{32,86} Ezen elváltozások elősegítik a sejtproliferációt, és magukban foglalják a *TP53* mutációit és a stabilizált p53-expressziót.^{87,88} A CK20 és a humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2) felülszabályozott expressziója, valamint a PTEN csökkent expressziója a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) útvonal egyidejű felülszabályozásával további közös jellemzők.^{89,90}

A MIBC és az NMIBC molekuláris jellemzői nagymértékben különböznek egymástól és bár a hólyagrág számos jellemzője jól illeszkedik ebbe a patofiziológiai modellbe, a klinikai viselkedés jelentős heterogenitást mutat.⁷⁶ A nem izominvazív hólyagrág (NMIBC) és az izominvazív hólyagrág (MIBC) több különböző molekuláris altípusának közelmúltbeli azonosítása arra utal, hogy az egyes fő útvonalakon belül több

alútvonal is létezik.⁷⁶ A DNS-ben és az RNS expresszió szintjén megjelenő genetikai elváltozások különböző molekuláris altípusok kialakulásához vezetnek, amelyeknek prognosztikai, prediktív és terápiás vonatkozásai vannak.¹ A kezdeti felismerések között szerepelt a hólyagrák magas mutációs terhelésének azonosítása, ami a biológiai alapot jelenti az immunellenőrzőpont-gátló terápiák sikeres alkalmazásához.⁹¹ Több csoport független erőfeszítései során azonosították a low grade NMIBC (*FGFR3*, *PIK3CA*, *STAG2*, *RTK/RAS/RAF* útvonal génjei) és a high grade MIBC/előrehaladott betegségben gyakran előforduló mutációkat (*ERBB2*, *TP53*, *RBI*, *MDM2*, *CDKN2A*, *KDM6A*, *ARIDIA*).¹ A daganatokat molekuláris altípusokba lehet sorolni (pl. lúminális, bazális / szkvamózus), mely beosztás információt ad a klinikai lefolyásról, például a neoadjuváns kemoterápiára vagy az immunterápiára adott válaszról és a progresszió kockázatáról.⁹²

Tekintve, hogy a hólyagrák jellemzően multifokális betegség, felmerül a klonalitás kérdése.³² Mivel egy betegen belül gyakran alakul ki több hólyagtumor, ez lehetővé teszi a klonalitás és a molekuláris evolúció vizsgálatát.⁷⁶ A multifokális hólyagrák eredetének magyarázatára jelenleg két megközelítés van érvényben.⁷⁶ Egyrészt az urothélium krónikus karcinogén expozíciója különböző gócból kiinduló, akár a fejlődés különböző stádiumában lévő daganatok párhuzamos (oligoklonális) kialakulásához vezethet.³² Másrészt, a műtét során felszabaduló daganatsejtek intraepithelialis implantálódásából, gócképzéséből vagy a kezdeti egyetlen tumorklónból más módon történő terjedésből többszörös monoklonális elváltozások keletkezhetnek.³² Míg néhány betegnél több, látszólag független tumor alakul ki (oligoklonális betegség), az ugyanazon betegből származó tumorok gyakran valamilyen módon kapcsolatban állnak egymással, és a különböző elváltozásokban a szubklonális genomális evolúcióra utaló jelek láthatók.⁹³⁻⁹⁵ Az egymással kapcsolatban álló tumorok molekuláris összetettsége arra utal, hogy egyes hólyagrákok jelentős intratumorális heterogenitást mutathatnak.⁷⁶ Míg több molekuláris markert vagy az egész genomra kiterjedő jellemzőket vizsgáló tanulmányok egyértelmű bizonyítékot szolgáltatottak az olyan daganatok szubklonális evolúciójára, amelyek egyetlen sejtől származtathatóak, az X-inaktivációs vizsgálat kimutatta, hogy bár néhány multifokális vagy metakrón tumor oligoklonális, a többség monoklonális.^{94,96-98}

I./2. Aneuploidia húgyhólyagrákban

A kromoszómákat először Hansemann (1890) írta le a rákos megbetegedésekben a karcinómák metafázisú sejtjeit vizsgálva. A normális 22 autoszóma számtól és egy nemi kromoszómapártól való eltérést aneuploidiának nevezik. Az aneuploidia a tumorok egyik jellegzetessége, ez az egyes kromoszómák sokszorozódásaként és/vagy elvesztéseként jellemzett sejtállapot egyes korai stádiumú rákos megbetegedésekben akár az egyetlen kimutatható rendellenesség lehet.⁹⁹ A háttérében álló kromoszómális instabilitás (CIN), mint a tumoros megbetegedések egyik központi folyamata egyre nagyobb érdeklődésre tart számot. A CIN jelenlegi vagy múltbéli jelenlétét jelzi a daganatsejtek aneuploidiája, tehát abnormális mennyiségű DNS tartalma.¹⁰⁰

A genomiális instabilitásnak két különböző típusa fordul elő az emberi rákos megbetegedésekben.¹⁰¹ Az instabilitás egyik formáját gyakran a hibás DNS-hibajavítás okozza, ami mikroszatellita-instabilitás (MSI) formájában nyilvánul meg, és pontmutációk vagy kisméretű inzerciók és deléciók megnövekedett gyakoriságát eredményezi. Az MSI nagyon ritka a hólyagrákban, bár a felső üregrendszeri uroteliális tumorokban valamivel gyakrabban fordul elő.¹⁰² Az invazív uroteliális tumorokra inkább a genomiális instabilitás második típusa, a CIN jellemző. A CIN-t kromoszóma fragmentumok vagy teljes kromoszómák elvesztése és/vagy többszöröződése jellemzi, ami aneuploidiát, valamint nagyméretű deléciók, intra- és interkromoszómális átrendeződések és génamplifikáció fokozott előfordulását eredményezi.¹⁰²

Bár a csíravonalbeli tetraploidia emlősökben tapasztalható letalitása ellenére a poliploidia normálisan előfordul néhány sejttypusban, továbbá egyes szervek hipertrófiájával és a celluláris stresszel kapcsolatban is előfordulhat, a sejtek DNS-tartalmának rendellenességeit (poliploidia és aneuploidia) mégis elsősorban a tumorképződéssel hozzák összefüggésbe, és a daganatos szövetek aneuploidiáját a rossz prognózis prediktoraként tartják számon.^{100,103,104} Mára világossá vált, hogy a sejtek aneuploidiája a karcinogenezis folyamatának egyik hajtóereje.¹⁰⁵ Számos adat utal arra, hogy a DNS-replikáció és a sejtosztódás (centroszóma szeparáció és kromoszóma szegregáció) hibás szabályozása összefügg mind az abnormális DNS-tartalom kialakulásával a sejtben, mind a tumorképződéssel.^{106,107,108-110} A nagymértékű, aneuploidiát eredményező genomiális instabilitást már nem csak a karcinogenezis

mozgatórugójaként, hanem a daganatokon belül és a daganatok között megfigyelhető genetikai heterogenitás és a gyógyszerrezisztencia kialakulásának fő tényezőjeként tartják számon.^{111,112}

A nem izominvazív hólyagrákok általában közel diploid kariotípussal és kevés genomiális átrendeződéssel rendelkeznek, míg az izominvazív tumorok aneuploidok és számos genomi átrendeződés jellemzi őket, mint amilyen a kromotripszis is.^{76,113} A nem invazív low grade papilláris tumorok korlátozott számú genomiális elváltozást mutatnak, elsősorban a 9p vagy 9q kromoszóma elvesztését és az *FGFR3* tirozin-kináz aktiváló mutációit. A meghatározott kromoszóma-rendellenességektől eltekintve ezek a daganatok általában közel diploidok, a génamplifikációk és *TP53* mutációk ritkák.¹⁰² Ezzel szemben a high grade és invazív növekedést mutató tumorok genetikailag instabillnak tekinthetők, szinte mindig aneuploidok, számos különböző kromoszóma-rendellenesség, köztük magas fokú amplifikációk jellemzik őket, genom sokszorozódás is előfordulhat.¹⁰²

A sejtek DNS-tartalmát a sejtosztódást végrehajtó apparátus szigorúan felügyeli a genomiális aberrációk, köztük a poliploidia és az aneuploidia megelőzése érdekében, és számos ellenőrző pont van érvényben, amelyek lehetővé teszik a DNS-replikáció és az azt követő sejtosztódás nyomon követését és szabályozását.^{103,107,114} A karcinogenezissel kapcsolatban jelenleg az az elmélet van érvényben, hogy a sejtosztódást végrehajtó apparátus sérülése a mitózis korai szakaszában epitheliális tumorokban kromoszóma-instabil sejtek létrejöttéhez vezethet, és ezek a genetikailag instabil sejtek a tumorképződés hajtóerejét biztosítják azáltal, hogy különböző, túlélési előnnyel járó genetikai elváltozással bíró utódsejteket hoznak létre.^{100,105,115} Izominvazív hólyagtumorokban a minikromoszóma fenntartó komplex 4 komponens (*MCM4*) gén mutációja, a DNS-javító és a DNS-károsodás ellenőrzőpont gének inaktiváló mutációi és számos más, a testvérkromatidák kohéziójában és szegregációjában szerepet játszó gén mutációja vezethet különböző kromoszóma-rendellenességekhez.^{76,116} A 9-es kromoszóma elvesztése vagy deléciói gyakoriak a nem izominvazív hólyagrákokban, és az érintett tumorsuppresszor gének (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *PTCH1*, *DBC1*, *TSC1*) inaktivációja az izominvazív tumorok több mint felében is előfordul.⁷⁶ A heterozigótaság elvesztése a 9-es kromoszóma rövid karján, a *CDKN2A* homozigóta deléciója és az általa kódolt p16 expressziójának kiesése nem izominvazív hólyagrákokban fokozott recidívákészséget jelez.¹¹⁷⁻¹¹⁹ A csökkent p16 expresszió az *RBI* fokozott expresszióját indukálja,

a kifejezetten emelkedett p16 expresszió pedig negatív visszacsatolás eredménye az *RBI* elvesztésével járó tumorokban.^{120,121} Mindkét elváltozás kedvezőtlen prognosztikai biomarker, amely az izominvazív tumorok több, mint felében megtalálható.¹²²

Baak és munkatársai egy retrospektív vizsgálat keretein belül automatizált képalapú citometriát (automated image-based cytometry-ICM) alkalmaztak a daganatszövetből szuszpendált egyes tumorsejtek magjában lévő DNS mennyiségének mérésére húgyhólyagrák szövetmintákon. Multivariáns analízisben a DNS-ICM mérés során nyert adatok a klasszikus prognosztikai faktoroknál pontosabban jelezték előre a betegség kiújulását és a stádium előrehaladását, függetlenül a kezelés módjától.¹²³ Korábban más csoportok is hasonló eredményekről számoltak be korai stádiumú hólyagrákos betegeknel, hólyagbiopsziás mintákban, hólyagmosó folyadékban és ürített vizeletben talált tumorsejtek alapján.^{100,124,125} Yamamoto és munkatársai az ICM aneuploidiát szintén a kiújulás prediktoraként azonosították, azonban multivariáns analízisben, amelyben az aneuploidia különböző más, nem hagyományos markerekkel került összehasonlításra, csak a tumor stádiuma és a tumor alakja bizonyult független prediktív faktornak.¹²⁶

Sokolova és munkatársai egy klinikai gyakorlatban alkalmazható, húgyhólyagrákok vizsgálatára alkalmas többpróbás FISH tesztet hoztak létre. A FISH-próbákat először a húgyhólyagrákban leggyakrabban előforduló génmutáció valamint kromoszómaszám-eltérések (azaz a 9p21 deléciója, valamint a 3, 7, 8, 9, 11, 15, 17, 18 és X kromoszóma számbeli növekedése) vizsgálatára választották ki. A legjobb próbakombinációnak a húgyhólyagrák kimutatására a 3-as, a 7-es és a 17-es kromoszómához, valamint a 9p21-es lókuszhhoz hibridizáló próbákat tartalmazó kombináció bizonyult, ami 92%-os szenzitivitást eredményezett az azonos mintákon végzett citológia 76%-os szenzitivitásával szemben. Ezen vizsgálatok vezettek az uroteliális karcinóma vizsgálatára szolgáló, ma már általánosan használt UroVysion FISH teszt kifejlesztéséhez.¹²⁷

II. CÉLKITŰZÉS

Az uroonkológia egyik legfontosabb kérdése a nem izominvazív húgyhólyagrákok izominvazív betegséggé való progressziójának előrejelzése. A nemzetközi irányelvek klinikopatológiai faktorokon alapuló rizikóbecslést javasolnak a progresszió valószínűségének meghatározására, azonban ezen rizikóskálák további pontosításra szorulnak. Ezért különböző megközelítéseket dolgoztak ki annak érdekében, hogy a molekuláris markerek hozzáadásával növeljék a nemzetközi rizikóstratifikációs irányelvek pontosságát, amelyek tekintetében a különböző vizsgálatok eddigi eredményei ígéretesek, de a rutin klinikai gyakorlatba még nem implementálhatóak.^{12,45}

Vizsgálatunk elsődleges célja klinikai gyakorlatba implementálható prognosztikai faktorok meghatározása volt fluoreszcens *in situ* hibridizációval, melyek képesek javítani a nemzetközi irányelvek által javasolt, konvencionális klinikopatológiai faktorokon alapuló rizikóbecslést nem izominvazív húgyhólyagrákban. A vizsgálati módszerünk alapja, hogy hólyagrákban végzett citogenetikai vizsgálatok kimutatták, hogy a különböző kromoszómák aneuploidiája magasabb szövettani grádussal és stádiummal korrelál.^{128–130} A hólyagrák progresszióját fokozott kromoszóma-instabilitás és aneuploidia kíséri.^{127,131} A citogenetikai vizsgálatok számos kromoszóma, köztük a 17-es kromoszóma gyakori eltérését mutatták ki a hólyagrákban, és kimutatták, hogy az erős poliszómia az uroteliális tumorsejtekben összefügg a nem izominvazív tumorok izominvazív betegséggé történő progressziójával.^{127,131,132} További vizsgálatok kimutatták, hogy a UroVysion-tesztel kimutatott aneuploidia korrelál a betegség invazivitásával.^{133,134} Más kutatócsoportok felvetették, hogy az izominvazív tumorstádiumokra jellemző citogenetikai elváltozások már a nagy progressziós kockázatú, minimálisan invazív daganatokban is jelen lehetnek.¹³² A HER2 egy sejtmembrán felszínéhez kötött receptor-tirozin-kináz, amit a 17-es kromoszómán található *HER2 (HER2/neu)* proto-onkogén kódol és részt vesz a sejtnövekedéshez és differenciálódáshoz vezető jelátviteli útvonalakban.¹³⁵ Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a *HER2* amplifikációja és/vagy fehérjéjének fokozott expressziója nem izominvazív hólyagrákokban rossz prognózissal társul.^{136–139} A *HER2* gén amplifikációja mellett a 17-es poliszómia a *HER2* gén térnyerése miatt a HER2 fehérje szintjének emelkedéséhez is vezethet.^{140,141} A *HER2* génhez hasonlóan a 17-es kromoszómán elhelyezkedő *TP53*

tumorszuppresszor gén és az általa kódolt p53 fehérje felelős a genomi integritás fenntartásáért, ezért a gén mutációi az egyik legkritikusabb eseményt jelentik a humán karcinogenezisben.¹⁴² A p53 fehérje overexpressziója korrelál a *TP53* mutációs státuszával, és a high grade uroteliális daganatokban prognosztikai jelentőséggel bír.^{143,144}

Bár a fent tárgyalt molekuláris markerek szerepét a hólyagrák etiopatogenezisében széles körben vizsgálták, és prognosztikai szerepük jól ismert, gyakorlati jelentőségüket a nem izominvazív hólyagrákok EAU és AUA szerinti prognosztikai osztályozásának javításában, és így az izominvazivitás előrejelzésében még nem vizsgálták. Mindezek alapján a nem izominvazív húgyhólyagrák fluoreszcens *in situ* hibridizációval történő lehetséges prognosztikai faktorainak meghatározásához a következő célokat fogalmazzuk meg:

1. Egy olyan új UroVysion alapú pontozási rendszer létrehozása (UroVysion FISH Score, UFS), amely a nem izominvazív hólyagrákok citogenetikai abnormalitásait vizsgálva előre jelezheti ezen daganatok biológiai viselkedését, különös tekintettel az izominvazív karcinómává történő progresszióra.
2. Annak felmérése, hogy az UFS által jelzett citogenetikai abnormalitási szint képes-e azonosítani az izominvazív tumorokat a műtétet megelőzően nyert vizeletmintákból.
3. Az UFS hozzáadott értékének vizsgálata a jelenlegi irányelvek által javasolt rizikóstratifikációhoz.
4. A 17-es kromoszóma kópiaszám-változások és a HER2 státusz prognosztikai értékének vizsgálata nem izominvazív húgyhólyagrák szövetmintákon a patológiai diagnosztikában rutinszerűen alkalmazott *HER2/Chr17* kettős *in situ* hibridizációs módszerrel.
5. A 17-es kromoszóma kópiaszám-változások, a *HER2* amplifikáció és overexpresszió, továbbá a p53 státusz széles körben elérhető immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs vizsgálatokkal történő kimutatásának a jelenlegi irányelvek által javasolt rizikóstratifikációhoz hozzáadott értékének vizsgálata.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet és a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Patológiai Intézet archívumából származó formalinban fixált, paraffinba ágyazott, transzuretrális hólyagtumorreszekció során nyert szövetmintákon, és a betegektől a tumorreszekciót megelőzően vett vizeletmintákon végeztük. A minták a 2005. és 2006. év során a Semmelweis Egyetem és Pécsi Tudományegyetem urológiai klinikáin kezelt betegektől származnak, a betegek követése a vizsgálat időpontjában aktuális nemzetközi irányelvek szerint történt a 2018. évig bekövetkezett utolsó urológiai vizsgálat időpontjával bezárólag. A vizsgálati protokoll a Helsinki Nyilatkozat (1975) etikai irányelveivel összhangban került felállításra és tanulmányainkat a regionális és az országos etikai bizottságok jóváhagyták (#21/2019 és #14383-2/2017/EKU).

III./1. A 3-as, 7-es, 9-es és 17-es kromoszóma aneuploidia prognosztikai szerepének vizsgálata vizeletmintákon

III./1.1. Betegek és a minták szövettani feldolgozása - Beteganyag I.

A mintagyűjtés során a betegek vizsgálatba történő beválasztásának kritériumai a következők voltak: betegek, akiknél 1) felmerült húgyhólyagrak gyanúja a cisztoszkópos vizsgálat alapján; 2) a vizeletminta vételét követő két napon belül a hólyag transzuretrális reszekciója (TURBT) elvégzésre került. A vizsgálatból kizártuk azon betegeket, akiknek a daganata nem uroteliális szövettani típusú volt, vagy az uroteliális rák valamely szövettani variánsát mutatta (pl. mikropapilláris, szarkomatoid, plazmocitoid), továbbá akiknél egyidejűleg más szervrendszer rosszindulatú betegsége is jelen volt. A vizsgálatba 87 beteget vontunk be: 57 NMIBC és 18 MIBC esetet, továbbá a kontroll csoportot alkotó 12 beteget (két beteget, akiknek a mintája szövettani eltérést nem tartalmazott, hat urocystitiszes beteget, két uroteliális hiperpláziás beteget és két uroteliális papillómás beteget).

A TURBT-mintákat 24 órán keresztül 10%-os formalinoldatban fixáltuk és paraffinba ágyaztuk (FFPE szövetblokkok). A szövettani diagnózist 3-5 µm vastagságú, hematoxilin-eozinnal (HE) festett szöveti metszeteken végeztük. A mintákat az uroteliális

daganatok 1973-as (grade 1-3 [G1-G2-G3]) és a 2004/2016-os (low grade [LG] – high grade [HG]) WHO-beosztás szerint értékeltük. A tumorstádium meghatározása az American Joint Committee on Cancer és az International Union Against Cancer (AJCC/UICC) Tumour, Node, Metastasis (TNM)-osztályozás 6./7./8. kiadása szerint történt.^{6,145} Amennyiben a beteg az eredeti műtétet követő 6 héten belül újbóli TURBT-on esett át, és újbóli stádiumbeosztásra került sor, a vizsgálatban a legmagasabb tumorstádium és grade lett figyelembe véve.

III./1.2. A UroVysion teszt protokollja

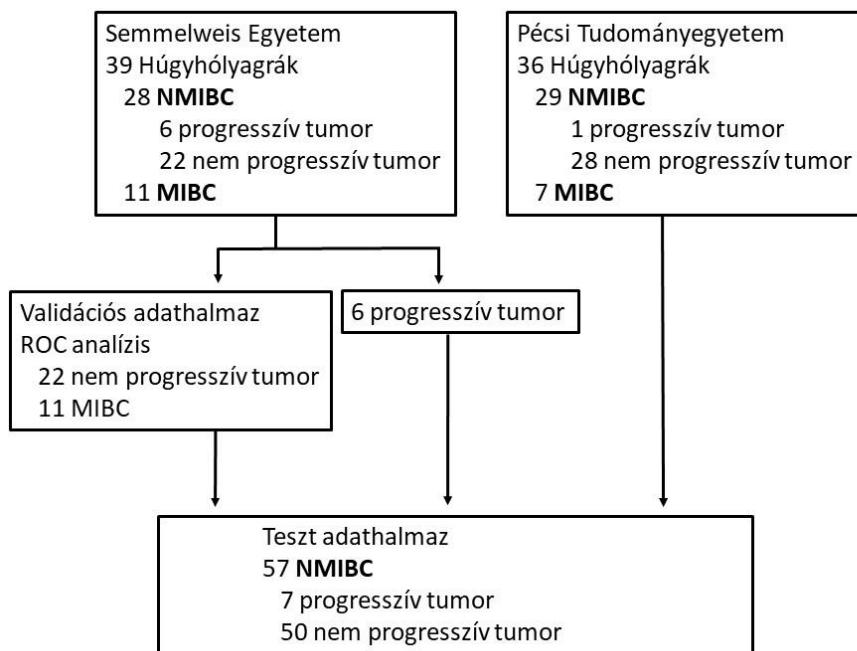
A UroVysion FISH-tesztet (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA) a vizeletben lévő daganatsejtek kimutatására fejlesztették ki, húgyhólyag- vagy felső üregrendszeri daganatok recidívájának monitorozása céljából. A teszt a vizelettel ürülő uroteliális daganatsejtekre jellemző citogenetikai elváltozásokat detektál négy fluoreszcensen jelölt próba segítségével. Ebből három centromer számoló próba (Centromere Enumeration Probe; CEP), melyek a 3-as, a 7-es és a 17-es kromoszóma centromer régiójához hibridizálnak, míg a negyedik próba a 9p21 lókuszhhoz kötődik, ami magában foglalja a *CDKN2A* gén szekvenciáját. A UroVysion FISH-tesztet a TURBT előtt vett reggeli friss, közepsugaras vizeletmintákon végeztük. A mintavételt követő 2 órán belül a vizelet 33 ml-ét 15 ml Carbowax-os fixálóoldattal (2% polietilén-glikol és 50% etanol) kevertük össze, ezt követően 4 °C-on tároltuk, majd a minták további feldolgozása a UroVysion kit gyárilag ajánlott leírásának megfelelően történt. Röviden összefoglalva, a vizelet sejtes elemeit centrifugálással elválasztottuk (600g, 10 perc), majd a felülúszót eltávolítva az üledékkel dolgoztunk tovább. Majd 10 ml PBS-sel történő mosás, újabb centrifugálás (600g, 10 perc) és a felülúszó ismételt eltávolítása után az üledéket kis térfogatú PBS-sel szuszpendáltuk fel, majd a felszuszpendált sejtekhez 5 ml jéghideg Carnoy fixálóoldatot (metanol (Fluka, Buchs, Svájc) és jégcet (Sigma-Aldrich, Seelze, Németország) 3:1 arányú keveréke) adtunk. Az elegyet 10 percen át inkubáltuk –20 °C-on, majd centrifugáltuk (600 g, 10 perc) és jól látható pellet keletkezése esetén a felülúszó elválasztása után a sejteket 500 µl fixálószerben vettük fel. A tárgylemezekre 3 µl, 10 µl és 30 µl sejtsuszpenziót cseppentettünk, és miután megszáradtak, a megfelelő sejtsűrűséget biztosító térfogatot mikroszkóp alatt választottuk ki. A kiválasztott lemezeket szárítás után 2x SSC (nátrium-klorid, nátrium-citrát puffer) oldatba helyeztük, 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd 1-es pH-jú 0,5 mg/ml koncentrációjú pepszin oldattal

15 percig emésztettük 37 °C-on. PBS-sel történő mosást (5 perc) követően a sejteket 1 %-os formaldehiddel 5 percig fixáltuk, ezt követően felszálló alkoholsorban inkubáltuk (70% - 85% - 100%) 1-1 percig, végül kiszárítottuk.

Az *in situ* hibridizációt a UroVysion kit előírásait követve hajtottuk végre. A sejtmagok láthatóvá tételéhez DAPI-festést használtunk. Az elkészített preparátumokat Leica DM RXA fluoreszcens mikroszkóppal (Leica, Wetzlar, Németország) vizsgáltuk Leica CW4000 FISH szoftver és SpectrumRed, SpectrumGreen, SpectrumAqua, SpectrumGold illetve DAPI/FITC/Texas Red szűrőkockák segítségével. A minták kiértékelését először a gyártó útmutatása szerint végeztük el. Röviden, azokat az eseteket tekintettük UroVysion teszt pozitívnak, melyek esetében legalább 25 morfológiailag és/vagy szignálmintázatát tekintve rendellenes sejtet vizsgálva legalább 12 sejt esetében az LSI 9p21 aranyárga szignál teljes hiánya (biállélikus deléció) volt észlelhető, vagy legalább 4 sejtben volt kimutatható egyszerre kettő a 3-as, 7-es vagy 17-es kromoszóma számbeli eltéréseiből. Ezt követően meghatároztuk a citogenetikai eltérést mutató sejtek arányát (%) a teljes elemzett (uroteliális) sejtpopuláción belül. Azokat a sejteket tekintettük citogenetikailag abnormálisnak, amelyekben a vizsgált markerekkel eltérések látszóttak.

III./1.3. A UroVysion FISH rizikóskála létrehozása

A kimutatott citogenetikai eltérések prognosztikai erejének értékelésére egy kvantitatív pontozási rendszert fejlesztettünk ki (UroVysion FISH Score, UFS). A progressziós pontszám optimális határértékének meghatározása érdekében a vizsgálatba bevont betegek egy részhalmazát vizsgáltuk, a határértéket a Semmelweis Egyetem 33 uroteliális karcinómával diagnosztizált betegének kvantitatív citogenetikai jellemzői közötti különbség alapján határoztuk meg. A vizsgált betegpopuláció 11 MIBC és 22 nem progresszív NMIBC beteget tartalmazott, akiknél a követés során soha nem alakult ki izominvazív betegség, és nem tartalmazott progresszív NMIBC eseteket, mivel az elsődleges cél a progressziós esemény előrejelzése volt. Ennek alapján a teszt adathalmaz (az összes NMIBC) független volt a validációs adathalmaztól a Pécsi Tudományegyetem összes NMIBC esete, valamint az összes progresszív NMIBC eset tekintetében. A mintagyűjtés folyamata és az egyes statisztikai osztályokba sorolt betegek száma az 2. ábrán látható.



2. ábra. A vizsgált statisztikai adathalmazok és a betegszelekció folyamatábrája.

Rövidítések: NMIBC= nem izominvazív húgyhólyagrák, MIBC= izominvazív húgyhólyagrák

(Kocsmár I, Pajor G, Gyöngyösi B et al., Am J Clin Pathol, 2020)¹⁴⁶

A betegek TURBT műtét előtt levett reggeli friss, középsugaras vizeletmintáit elemeztük. A minták összes sejtjében megvizsgáltuk a vörös-, kék-, zöld- és aransárga fluoreszcens jeleket (3. ábra). Ezt követően kiválasztottuk a tumoros fenotípust és/vagy abnormális UroVysion jelmintázatban megnyilvánuló genotípusos eltérést mutató sejteket, és a továbbiakban ezeket elemeztük, míg a nem daganatos sejteket (limfociták, normális átmeneti sejtek stb.) kizártuk a vizsgálatból. A vizeletmintákat a gyártó kritériumainak megfelelően értékeltük. A UroVysion diagnosztikus kritériumai szerint negatív vizeletmintákkal rendelkező hólyagrákos esetek (7 eset) sejtjeinek jelmintázatát nem vizsgáltuk részletesen, hanem eltérés nélkülinek tekintettük, ennek a normál állapotnak prognosztikai értéke is van elemzésünkben. Ezt követően a UroVysion pozitív eseteknél minden tumoros fenotípust és/vagy genotípusos eltérést mutató sejtben a 3-as, 7-es, 17-es kromoszómák kópiaszám-gyarapodását vagy csökkenését és a 9-es kromoszóma kópiaszám-gyarapodását rögzítettük, és ezek abszolút értékét hozzáadtuk a normál kromoszómaszámhoz (2), majd ezt a négy számot átlagoltuk (átlagos korrigált

kromoszómaszám / Average Corrected Chromosome Number, ACCN). Receiver operating characteristic (ROC) görbékét készítettünk, és kiszámítottuk a ROC-görbe alatti területet (AUC), hogy értékeljük az egyes kromoszómák kópiaszám változásainak, valamint ezek kombinációjának (ACCN) hasznosságát a hólyagrák izominvazivitásának előrejelzésére. Az AUC a 3-as kromoszóma esetében 0,909, a 7-es kromoszóma esetében 0,901, a 17-es kromoszóma esetében 0,855, a 9-es kromoszóma esetében pedig szintén 0,855 volt, míg az ACCN ROC-görbe alatti területe 0,897 volt. Mivel az AUC nagyon hasonló volt az egyes kromoszómák és az ACCN esetében, a továbbiakban az átlagos korigált kromoszómaszámmal számoltunk tovább. Az ACCN optimális határértékét ROC-görbével azonosítottuk Youden-index használatával, így számításaink szerint az ACCN optimális határértéke 3,435, ezzel az értékkel elkülönítve a NMIBC és MIBC eseteket a szenzitivitás 81,8%, a specificitás 90,91%. Az ACCN optimális határértékével összhangban a 3,5 értéket választottuk határértéknek, mivel ez könnyen kezelhető és nem igényel bonyolult számításokat a FISH-értékelés során a mindennapi diagnosztikai gyakorlatban (ha a kromoszómák átlagos abszolút száma egy tumorsejtben 14, az ACCN 3,5).

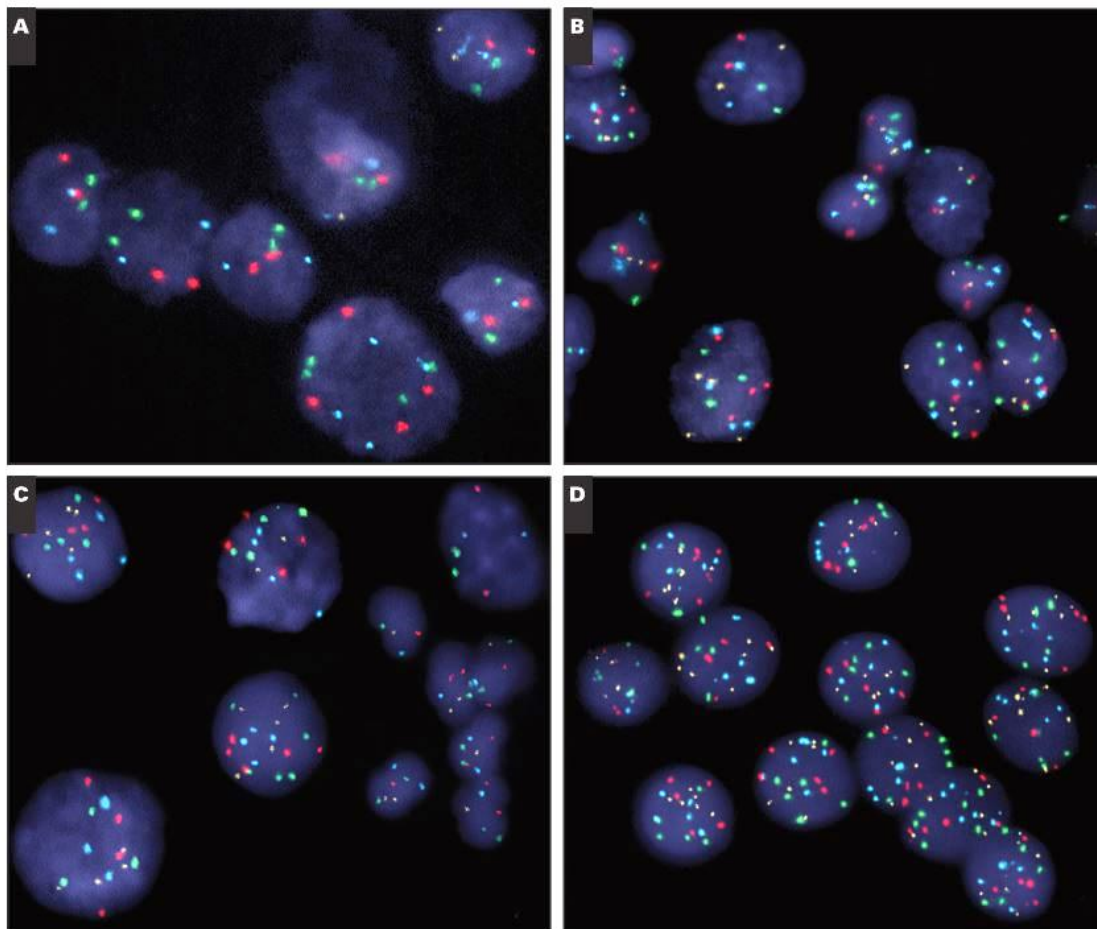
Ezt követően a mintában mért legnagyobb kópiaszám-gyarapodás szerint is megvizsgáltuk a UroVysion pozitív eredményt adó mintákat. Amennyiben a NMIBC és MIBC eseteket aszerint különítjük el, hogy azokat tekintjük izominvazivitás szempontjából pozitívnak, amelyeknél legalább egy tumorsejt legalább egy kromoszóma tetraszómiáját mutatja, a szenzitivitás 100,00%, a specificitás pedig 36,36%. Az előzőek szerint amennyiben a pentaszómiás tumorsejttel rendelkező esetek az izominvazivitás pozitívak, a szenzitivitás 100,00%, a specificitás pedig 59,09%, míg hexaszómia esetében a szenzitivitás 90,91%, a specificitás pedig 86,36%. Ezen számítások alapján a 3,5-nél alacsonyabb ACCN-nel rendelkező, de magas kromoszóma kópiaszám-gyarapodást mutató sporadikus tumorsejtekkel rendelkező esetek progresszióra való kockázatát is magasnak tekintettük.

A diagnosztikai célú (gyártó által ajánlott) értékelési séma és az új prognosztikai pontozás összehasonlítása az 1. táblázatban látható. Az UFS csoportokba tartozó esetek reprezentatív képei az 3. ábrán láthatók. Az UFS I és UFS II csoportokat progresszió szempontjából alacsony, míg az UFS III csoportot magas kockázatúként határoztuk meg.

1. táblázat. A diagnosztikai célú (gyártó által ajánlott) értékelési séma és az új prognosztikai pontozás összehasonlítása.

Rövidítések: ACCN= átlagos korigált kromoszómaszám, FISH= fluoreszcens *in situ* hibridizáció

UroVysion gyártói kritériumok		UroVysion FISH rizikóskála	
Vizsgált sejtek és jelmintázat	A jelmintázatot akkor tekintjük pozitívnak, ha legalább négy sejtben a 3-as, 7-es vagy 17-es kromoszómák közül minimum kettő számbeli növekedést mutat (3 vagy több van belőle), vagy a 9p21 biallélikus deléciója áll fenn minimum 12 sejtben. A morfológiailag abnormális sejteket (nagy magméret, szabálytalan magforma, "foltos" DAPI-festés, összefüggő sejtcsoportok) kell először értékelni. Ha a sejtek abnormális jelmintázatot mutatnak, ezeket a sejteket akkor is vizsgálni kell, ha morfológiailag nem abnormálisak.	Vizsgált sejtek és jelmintázat	A morfológiailag abnormális sejtek (nagy magméret, szabálytalan magforma, "foltos" DAPI-festés, összefüggő sejtcsoportok) és az abnormális kromoszómamintázatú sejtek (melyek a UroVysion teszt diagnosztikai kritériumainak megfelelnek és/vagy egyéb elváltozásokat mutatnak, mint például 9p21 inkomplett deléció, 9p21 többlet, a 3-as, 7-es vagy 17-es kromoszóma számbeli növekedése vagy deléciója) kromoszómamintázata kerül feljegyzésre.
Negatív	Bármely normálistól eltérő, de a UroVysion kritériumai szerint nem értékelendő jelmintázat. <4 sejtben figyelhető meg egy sejtben belül legalább 2 kromoszóma számbeli növekedése, vagy <12 sejtben áll fenn a 9p21 biallélikus deléciója.	UFS I.	<4 sejtben figyelhető meg egy sejtben belül legalább 2 kromoszóma számbeli növekedése, vagy <12 sejtben áll fenn a 9p21 biallélikus deléciója.
Pozitív	≥4 sejtben figyelhető meg egy sejtben belül legalább 2 kromoszóma számbeli növekedése, vagy ≥12 sejtben a 9p21 biallélikus deléciója áll fenn.	UFS II.	9p21 biallélikus deléciója és/vagy ACCN<3,5.
		UFS III.	ACCN≥3,5 és/vagy legalább egy sejtben legalább egy kromoszómából legalább 6 kópia jelen van.



3. ábra. A UroVysion FISH rizikóskála szerint értékelt eseteket bemutató reprezentatív képek.

A különböző képek különböző NMIBC esetek vizeletcitológiai mintáin végzett Urovysion FISH teszt eredményeit ábrázolják (egymást követő betűkkel jelölve a progresszió szempontjából legkisebb rizikóval rendelkező /A/-tól a legnagyobb rizikóval rendelkező /D/-ig); **A:** UFS II csoportba tartozó eset, melyben a tumorsejtek a 9p21 lókuszt biallélikus delécióját mutatják, továbbá az ACCN kevesebb, mint 3,5, **B:** UFS II csoportba tartozó eset, melyben az ACCN kevesebb, mint 3,5, **C,D:** UFS III csoportba tartozó esetek, melyekben az ACCN nagyobb, mint 3,5. A UroVysion FISH jelek: 3-as kromoszóma centromer – vörös; 7-es kromoszóma centromer – zöld; 17-es kromoszóma centromer – világoskék; 9p21 lókuszt (p16 fehérjét kódoló gén) – aranyárga; sejtmag – szürkés-kék szín (eredeti nagyítás: 1000x). Rövidítések: FISH= fluoreszcens *in situ* hibridizáció, NMIBC= nem izominvazív húgyhólyagrák, UFS= UroVysion FISH rizikóskála, ACCN= átlagos korrigált kromoszómaszám (Kocsmár I, Pajor G, Gyöngyösi B et al., Am J Clin Pathol, 2020)¹⁴⁶

III./1.4. Az NMIBC betegek prognózis szerinti kockázati csoportba sorolása a jelenlegi nemzetközi irányelvek szerint

Az NMIBC betegeket az izominvazívva történő progresszió szempontjából az EAU és az EORTC rizikóbecslő táblái szerint alacsony, közepes, magas és nagyon magas, illetve az AUA irányelveinek kritériumai alapján alacsony, közepes és magas kockázati csoportokba soroltuk.^{35,145} Ezt követően, külön-külön dichotóm skálát állítottunk fel ezen klinikai NMIBC rizikóskálák mindegyikére, az alacsony és közepes kockázati eseteket egy közös alacsony kockázati csoportba összevonva, míg a magas és (ahol rendelkezésre állt) nagyon magas rizikójú betegeket a magas kockázati csoportba soroltuk.

III./1.5. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket az SPSS Statistics for Windows ver. 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) és az R 3.3.1 verziójú (R Core Team (2016) szoftverek segítségével végeztük.¹⁴⁷ A grafikonok készítéséhez a GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) programot használtuk. A szignifikancia határértéke minden esetben 0,05 volt. Aszimmetrikus mintaeloszlás esetén a nem parametrikus Mann-Whitney U tesztet használtuk. A kategorikus változókat khi-négyzet és Fisher-egzakt tesztek segítségével hasonlítottuk össze. A kiújulásmentes túlélést (RFS), a progressziómentes túlélést (PFS) és a progresszióig eltelt időt (TTP) az NMIBC betegek esetében a kezdeti diagnózistól a betegség nem izominvazív daganatként történő kiújulásának időpontjáig (RFS), az izominvazív daganattá történő progresszió vagy halál időpontjáig (PFS), illetve az izominvazív daganattá történő progresszió időpontjáig (TTP) eltelt időszakként határoztuk meg. Bár általában a "progresszió" a PFS és a TTP esetében a stádium előrehaladását jelenti, ez a mi vizsgálatunk esetében az NMIBC alcsoportban izominvazív betegséggé történő progressziót jelent, mivel a követési időszak alatt nem történt Ta stádiumból T1 stádiumba történő progresszió. Ebből kifolyólag a továbbiakban a "progresszió" kifejezést általánosságban a nem izominvazív húgyhólyagrákból izominvazív daganattá való átmenet kifejezésére használjuk. A túlélési elemzésekhez Kaplan-Meier analízist és log-rank tesztet használtunk. A klinikopatológiai adatok és az UFS prognosztikai értékének meghatározásához többváltozós Cox-analízist használtunk.

Az UFS nemzetközi irányelvek által ajánlott rizikóbecslő skálákhoz való hozzáadott prognosztikai értékének vizsgálatához Harrell-féle C-statisztikát alkalmaztunk. Annak érdekében, hogy értékeljük az UFS diagnosztikai pontosságát az izominvazív hólyagtumoros (MIBC) vagy progresszív NMIBC betegek (azon nem izominvazív hólyagtumoros betegek, kiknek a tumora a követés során izominvazívvá progrediált) kimutatásában, kiszámítottuk az UFS érzékenységet, specificitását, pozitív prediktív értékét (PPV) és negatív prediktív értékét (NPV). A 0,05-nél kisebb p-értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

III./2. A 17-es poliszómia, a HER2 státusz és a TP53 mutáció prognosztikai értékének vizsgálata szöveti mintákon

III./2.1. Betegek és a minták szövettani értékelése - Beteganyag II.

A vizsgálat során 102 eset TURBT műtét során nyert szövetszövetmintáit vizsgáltuk retrospektív módon: 90 NMIBC beteg és a kontroll csoportot alkotó 12 rosszindulatú hólyagtumorral nem rendelkező beteg (két minta patológiai elváltozás nélkül, hat cystitis, két uroteliális hiperplázia és két uroteliális papilloma) mintáját elemeztük. A vizsgálatba nem vontuk be azokat a betegeket, akiknek a daganata nem uroteliális típusú volt vagy az uroteliális rák valamely szövettani variánsát mutatta (pl. mikropapilláris, szarkomatoid, plazmocitoid), vagy anamnézisében felső üregrendszeri tumor szerepelt, illetve akiknél egyidejűleg más szervrendszer rosszindulatú daganata vagy malignus hematológiai megbetegedés volt jelen. A 90 NMIBC betegből 20 rendelkezett recidív tumorról, 42 pTa stádiumú, 47 pT1 stádiumú és 1 pTis stádiumú volt.

A betegek orvosi dokumentációjából a kigyűjtött változók közé tartozott az életkor, a nem, a szövettani grade, a tumorstádium, tumorméret, a tumorok száma és primer vagy recidív jellege, történt-e adjuváns instilláció (BCG vagy kemoinstilláció), a követési idő (hónapokban), az izominvazívvá történő progresszióig eltelt idő (hónapokban) és a tumor kiújulása. A mintákat hisztopatológiai újraértékelték egy uroonkológiában jártas patológus (Dr. Székely Eszter). Az esetek mind a WHO az uroteliális daganatok 1973-as (grade 1-3 [G1-G2-G3]), mind a 2004/2016-os (low grade [LG] – high grade [HG]) beosztás szerint értékelték, a stádiumok pedig az AJCC/UICC TNM-osztályozás 8. kiadása szerint lettek meghatározva.⁶

A betegek követését a nemzeti irányelveknek megfelelően végeztük és a dokumentációban szereplő legutolsó cisztoszkópia időpontjában cenzúráztuk. Progresszióként definiáltuk, amennyiben egy beteg tumora inzominvazív (T2 vagy magasabb stádiumú) tumorként recidívált. A progresszióig eltelt időt az elemzett daganat TURBT műtétjének időpontjától a progresszió bekövetkeztéig eltelt időben határoztuk meg. A beteget progresszió szempontjából történő rizikóbesorolását mind a WHO 2004/2016-os, mind a WHO 1973-as osztályozási rendszere alapján elvégeztük, a mintákat az EAU rizikóbecslő táblájának eredeti változata és annak 2021-es újabb verziója szerint progresszió szempontjából alacsony, közepes, magas és nagyon magas kockázatú csoportokba soroltuk.^{45,145} A rizikóbesorolást az EORTC és az AUA nem inzominvazív hólyagrákra vonatkozó rizikóbecslő táblái szerint is elvégeztük.^{35,66}

III./2.2. Immunhisztokémiai vizsgálat

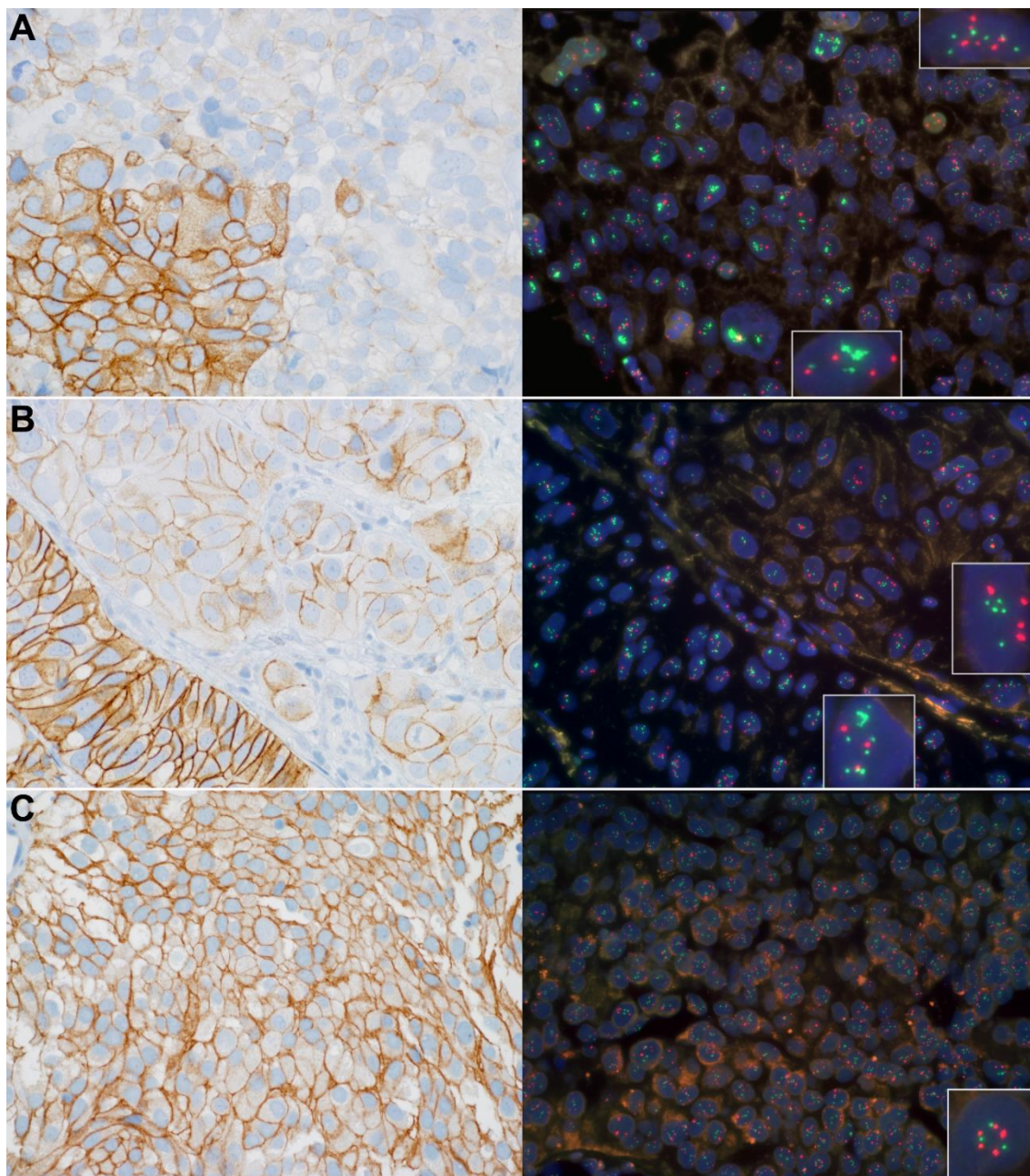
A 3-5 µm vastagságú szövetszöveteket standard 10%-os formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetblokkokból készítettük el, és hematoxilín-eozinnal (HE) festettük meg. A HER2 immunhisztokémiai vizsgálatot (IHC) anti-HER2/c-erbB-2 antitesttel (Novocastra, Newcastle upon Tyne, Egyesült Királyság; CB11 klón), a p53 IHC-t pedig anti-p53 antitesttel (Dako, Glostrup, Dánia; DO-7 klón) végeztük Ventana Benchmark Ultra automatizált immunfestő automata és UltraView DAB detektáló kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) használatával. A metszetekről a felvételeket DP70 színes kamerával felszerelt Olympus BX51 mikroszkóppal (Olympus, Tokió, Japán) készítettük. A HER2 IHC kiértékelését az American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists (ASCO/CAP) 2018-as, emlőrákra vonatkozó iránymutatásai szerint végeztük el.¹⁴⁸ A HER2 festődést kezdetben két vizsgáló (Dr. Kocsmár Ildikó és Prof. Dr. Kulka Janina) egymástól függetlenül, az esetekre vonatkozó egyéb információikra vakon értékelve besorolta 0, 1+, 2+ és 3+ fokozatba az ASCO/CAP 2018-as iránymutatásai szerint, majd egy második körben közösen konszenzusos besorolást állapítottak meg a nem egyező HER2 IHC fokozatú eseteknél. HER2 festődési heterogenitást azokban az esetekben állapítottunk meg, amelyeknél a mintán belül élesen elkülönülő tumorterületek membránfestődésének intenzitása legalább kétfokozatú különbséggel volt jellemezhető. A p53 festődést is először a betegekre vonatkozó egyéb információikra vakon értékelte két vizsgáló

egymástól függetlenül (Dr. Kocsmár Ildikó és Dr. Lotz Gábor), majd az eltérő besorolású eseteket egy második körben ismét közösen értékelték újra. Egy eset p53 státuszát akkor tekintettük negatívnak, ha a pozitív nukleáris festődési arány az összes tumorsejt 1-49%-a között volt (ami vad típusú p53-nak felel meg), míg a 0% és az 50-100% közötti festődési arányt pozitív p53-státusznak tekintettük (abnormális p53 IHC-mintázat).¹⁴³

III./2.3. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció

Standard formalinban rögzített, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetblokkokból 3-5 µm vastagságú szövetmetszeteket készítettük. A *HER2* gén és a 17-es kromoszóma centromér régiójának (Chr17) FISH-analízisét a ZytoLight SPEC *HER2*/CEN 17 Dual Color Probe Kit (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Németország) használatával végeztük. A tárgylemezeket DAPI, Spectrum Green és Spectrum Orange szűrőkkel (Vysis, Downers Grove, IL, USA) felszerelt Leica DM RXA (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Leica DFC365 FX monokróm kamerával és Leica CW4000 FISH szoftverrel reprezentatív képi dokumentációt készítettünk. A *HER2* FISH vizsgálat kiértékelését az ASCO/CAP 2018-as, emlőrákra vonatkozó iránymutatásai szerint végeztük.¹⁴⁸ A FISH jelmintázatot minden esetben két vizsgáló (Dr. Kocsmár Ildikó és Dr. Lotz Gábor) egymástól függetlenül értékelték, majd szakértői validálás és konszenzusos eredmény következett, a betegekre vonatkozó egyéb információkra vakon. A *HER2* és Chr17 jeleket legalább 20-20 sejtmagban számoltuk meg a két leginkább amplifikált és/vagy poliszómiás tumorsejt populációt tartalmazó területről. Csak azokat a sejteket vizsgáltuk, melyekben fellelhető volt mind a *HER2* gén, mind a Chr17 centromer szekvenciájához hibridizáló jel legalább egy kópiája. A *HER2* amplifikáció meghatározására a 2018-as ASCO/CAP ajánlás kritériumait alkalmaztuk.¹⁴⁸ A 17-es kromoszóma poliszómia kritériumának korábbi irodalmi adatoknak megfelelően azt tekintettük, ha a Chr17 jel/sejt arány átlaga legalább 2,25 volt a megszámlált teljes tumorsejt-populációban.¹⁴⁹ Előző vizsgálatunk alapján erős poliszómiaként definiáltuk a legalább 3,45 Chr17 jel/sejt arányt a megszámlált teljes tumorsejt populációban.¹⁴⁶ A Chr17 jel/sejt arányt nem csak a teljes mintában, hanem minden esetben külön a poliszómás sejtpopulációban is rögzítettük, így azonosítottuk azokat az eseteket, ahol egy erős poliszómiás, de a tumorsejtek kisebb arányát képviselő, különálló daganatsejt populáció volt megfigyelhető.

A HER2 IHC, *HER2* FISH és a 17-es kromoszóma FISH vizsgálatával kapott eredményeket bemutató reprezentatív képeket az 4. ábra mutatja be.



4. ábra. A HER2 IHC, *HER2* FISH és a 17-es kromoszóma FISH vizsgálatával kapott eredményeket bemutató reprezentatív képek.

HER2 fehérje immunhisztokémiai, *HER2* gén / 17-es kromoszóma centromer kettős színű fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) vizsgálati eredményei három különböző esetből

(A, B, C eset). A *HER2*-amplifikáció többnyire (egy eset kivételével) erős *HER2*-fehérjeexpresszióval járt együtt. A Chr17 poliszómia a *HER2* immunhisztokémiai expressziójának széles spektrumához társult, a negatívtól az erős (3+) pozitivitásig. A *HER2* IHC pozitívítás (balra) barna sejtmembrán festődésként jelent meg (eredeti nagyítás: 600X). A *HER2*/Chr17 FISH (jobbra; a jellegzetes sejtmagok nagyobb nagyításban a beillesztett képeken láthatók) megjelenítése: *HER2* gén - zöld jelek és/vagy jelcsoportok; 17-es kromoszóma centromer - vörös jelek; sejtmag - világoskék szín (eredeti nagyítás: 630X).

A: Kifejezett *HER2* fehérjeexpresszió heterogenitás: erős teljes membránpozitívítás (3+) a bal alsó kvadránsban és gyenge (0-1+) *HER2*-festődés a fennmaradó részen. A 3+ *HER2* IHC-pozitívítás területének megfelelően a FISH képen 17-es poliszómia és az ehhez társuló *HER2* génamplifikáció ($HER2/Chr17$ arány ≥ 2) (alsó beillesztett kép) volt kimutatható, míg a Chr17 erős poliszómiájához (jobb felső beillesztett kép) csak 0-1+ IHC-expresszió társult. A *HER2*-amplifikált és a nem amplifikált tumorrészek szövettani fenotípusa hasonló volt.

B: *HER2* fehérjeexpresszió heterogenitás: erős teljes membránpozitívítás (3+) a bal alsó területen és mérsékelt (2+) *HER2* festődés a fennmaradó részen. A 3+ *HER2* IHC-pozitívítás területének megfelelően a FISH képen a 17-es poliszómia és az ehhez társuló *HER2* génamplifikáció ($HER2/Chr17$ arány ≥ 2) (alsó beillesztett kép) volt kimutatható, míg a Chr17-es poliszómiához (jobb felső beillesztett kép) csak 2+ IHC-expresszió társult. A *HER2*-amplifikált és a nem amplifikált tumorrészek szövettani fenotípusa jelentősen különbözött egymástól.

C: Diffúz *HER2* fehérjeexpresszió: erős teljes membránfestődés a teljes tumorsejt-populációban (3+). A FISH képen a Chr17 nagyfokú poliszómiája látható a *HER2* gén amplifikációja nélkül.

Rövidítések: IHC= immunhisztokémia, Chr17= 17-es kromoszóma (Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G et al., *Cancers (Basel)*, 2022)¹⁵⁰

III./2.4. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket az R 3.3.1 verziójú (R Core Team (2016) szoftver segítségével végeztük.¹⁴⁷ A klinikai paraméterek, a patológiai jellemzők és az IHC- és FISH-elemzések eredményeinek összehasonlítására Fisher-egzakt tesztet használtunk. A TTP Kaplan-Meier görbéket a ggplot2, survival és survminer R package használatával készítettük, majd log-rank analízist végeztünk a két csoport közötti különbség meghatározására. Azokat a betegeket, akik a progresszió előtt más okból meghaltak, a halál időpontjában cenzúráztuk. A survival package segítségével egyváltozós és többváltozós Cox-analíziseket végeztünk, a vizsgált faktorok prognosztikai értékének meghatározására Harrell-féle C-statisztikát alkalmaztunk. A 0,05-nél kisebb p-értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

IV. EREDMÉNYEK

IV./1. A UroVysion FISH rizikóskála prognosztikai értékének vizsgálata

A betegek demográfiai adatait és a reszekált szövetek patológiai vizsgálatának eredményeit (a tumorok stádiuma és fokozat szerinti megoszlása) az 2. táblázat tartalmazza. A vizsgálatba bevont betegek által kapott kezeléseket a 3. táblázat részletezi.

2. táblázat. A vizsgált esetek demográfiai adatai és a reszekált szövetek patológiai vizsgálatának eredményei.

Rövidítések: UC= uroteliális carcinoma, G1= grade 1, G2= grade 2, G3= grade 3, LG= low grade, HG= high grade, UFS= UroVysion FISH rizikóskála

Vizsgált esetek	Jóindulatú szövet	UC	Szöveti grade					Patológiai stádium		
			G1	G2	G3	LG	HG	Ta	T1	T2
n	12	75	11	39	25	29	46	28	29	18
Tumortípus (primer/ recidív)		68/7	7/ 4	37/ 2	24/1	25/ 4	43/ 3	25/ 3	27/ 2	16/ 2
Recidíva követés során	Jóindulatú szövet	UC	G1	G2	G3	LG	HG	Ta	T1	T2
igen		34	9	13	12	16	18	12	16	
nem	12	41	2	26	13	13	28	16	13	
Progresszió követés során	Jóindulatú szövet	UC	G1	G2	G3	LG	HG	Ta	T1	
igen		17	1	5	11	3	14	1	6	
nem	12	58	10	34	14	26	32	27	23	
Halálozás követés során	Jóindulatú szövet	UC	G1	G2	G3	LG	HG	Ta	T1	
urológiai kórok következtében	0	15	0	4	11	1	14	0	4	
nem urológiai betegség miatt	5	25	3	14	8	9	16	9	12	
UroVysion FISH rizikóskála csoport	Jóindulatú szövet	UC	G1	G2	G3	LG	HG	Ta	T1	T2
UFS I	12	8	2	5	0	7	0	7	0	0
UFS II	0	34	8	21	6	19	16	18	16	1
UFS III	0	33	1	13	19	3	30	3	13	17

UroVysion FISH rizikóskála csoportok kombinációi	<i>Jóindulatú szövet</i>	<i>UC</i>	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>LG</i>	<i>HG</i>	<i>Ta</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>
UFS alacsony rizikó (UFS I-II)	12	42	10	26	6	26	16	25	16	1
UFS magas rizikó (UFS III)	0	33	1	13	19	3	30	3	13	17

3. táblázat. A vizsgált esetek kezelési adatai a UroVysion FISH rizikóskála csoportok szerinti bontásban. A táblázat a nem izominvazív hólyagtumoros betegek kezelésére vonatkozik a teljes követési időszak alatt.

Rövidítések: UFS= UroVysion FISH rizikóskála, BCG= Bacillus Calmette–Guérin, TURBT= transzuretrális hólyagtumor reszekció

UFS csoport	I	II	III
BCG terápia	1	7	5
Intravezikális kemoterápia	4	13	5
Szisztémás kemoterápia	0	0	1
TURBT recidíva miatt	3	7	1
Cisztectómia	0	1	3
Radioterápia	0	0	3
Nincs adat	1	10	1

A gyártó által javasolt értékelési séma alkalmazásával a UroVysion teszt a 75 húgyhólyagrákos esetből 68 esetben mutatott pozitív eredményt (két TaG1 és öt TaG2 szövettani diagnózisú tumorral rendelkező beteg vizeletmintája nem tartalmazott megfelelő számú, a teszt pozitivitási kritériumainak megfelelő citogenetikai elváltozást mutató sejtet). A követési adatokat és eredményeket a 4., 5., 6. táblázat, és 7. táblázat, valamint a 5. ábra mutatja be.

4. táblázat. A nem izominvazív hólyagtumorok Cox-analízisének eredményei.

Jelmagyarázat: Tumor típus^a: primer vagy recidív tumor, UFS magas/alacsony: UroVysion FISH rizikóskála alacsony rizikóval rendelkező csoportjai (I-II) / UroVysion FISH rizikóskála magas rizikóval rendelkező csoportja (III), szövettani grade^b: grade 1-2 / grade 3, stádium^c: Ta / T1.

Rövidítések: UFS= UroVysion FISH rizikóskála, HR= relatív hazard, CI= konfidencia intervallum, PFS= progressziómentes túlélés, TTP= progresszióig eltelt idő, G1= grade 1, G2= grade 2, G3= grade 3, LG= low grade, HG= high grade, KMSA= Kaplan-Meier analízis

	végpont	változó	HR	CI	p-érték	
Stádium	PFS	Ta-T1	2,549	1,140-5,698	0.018	Cox
	TTP	Ta-T1	6,412	0,769-53,463	0.086	Cox
Szövetteni grade	PFS	G1-G2-G3	2,383	1,250-4,542	0.008	Cox
	TTP	G1-G2-G3	2,266	0,654-7,856	0.193	Cox
Szövetteni grade	PFS	LG - HG	2,526	1,146-5,566	0.018	Cox
	TTP	LG - HG	2,814	0,541-14,624	0.199	Cox
Citogenetikai eltérést mutató sejtek %	TTP	%	1,028	1,005-1,050	0.007	Cox
	TTP	% medián alatt/ medián felett (=12,00)	3,368	0,653-17,380	0.123	Cox
	TTP	% átlag alatt/ átlag felett (=23,47)	2,945	0,656-13,213	0.139	Cox
UroVysion FISH rizikóskála multivariáns analízis						
	PFS				<0.001	Cox
		Tumor típus ^a	1,928	0,435-8,554	0.388	
		Kor	1,081	1,032-1,133	0.001	
		UFS magas/alacsony	5,613	2,354-13,385	<0.001	
UroVysion FISH rizikóskála multivariáns analízis						
	TTP				<0.001	Cox
		Tumor típus ^a	6,069	1,081-34,058	0.040	
		Kor	1,033	0,933-1,143	0.533	
		UFS magas/alacsony	24,058	2,718-212,934	0.004	
UroVysion FISH rizikóskála multivariáns analízis						
	PFS				<0.001	Cox
		Kor	1,073	1,024-1,124	0.003	
		Tumor típus ^a	2,936	0,592-14,575	0.188	
		Szövetteni grade ^b	1,821	0,875-3,788	0.109	
		Stádium ^c	1,111	0,429-2,881	0.828	
		UFS magas/alacsony	3,797	1,446-9,972	0.007	

UroVysion FISH rizikóskála multivariáns analízis						
	TTP				< 0.001	Cox
		Kor	1,019	0,925-1,123	0.696	
		Tumor típus ^a	5,974	0,829-43,051	0.076	
		Szövettani grade ^b	1,214	0,255-5,782	0.808	
		Stádium ^c	1,832	0,198-16,983	0.594	
		UFS magas/alacsony	16,301	1,438-184,803	0.024	
UFS	PFS	UFS magas/alacsony	4,089	1,816-9,206	< 0.001	Cox
	TTP	UFS magas/alacsony	22,076	2,582-188,718	< 0.001	Cox
UFS	PFS	UFS magas/alacsony	6,893	2,399-19,80	< 0.001	KMSA
	TTP	UFS magas/alacsony	34,05	5,841-198,5	< 0.001	KMSA

5. táblázat. A Kaplan-Meier analízis eredményei a nem izominvazív hólyagrákok esetében.

A túlélési görbék közti különbséget log rank teszttel határoztuk meg. Rövidítések: PFS= progressziómentes túlélés, TTP= progresszióig eltelt idő, RFS= recidíva-mentes túlélés, G1= grade 1, G2= grade 2, G3= grade 3, LG= low grade, HG= high grade, UFS= UroVysion FISH rizikóskála, EAU= Európai Urológus Társaság, EORTC= Európai Rákkutató és Terápiás Szervezet, AUA= Amerikai Urológus Társaság

	PFS p-érték	TTP p-érték	RFS p-érték
Stádium Ta vs. T1	0,020	0,051	0,327
Szövettani grade G1 vs. G2 vs. G3	0,013	0,247	0,009
G1 vs. G2	0,360	0,986	0,003
G2 vs. G3	0,015	0,109	0,081
G1 vs. G3	0,016	0,340	0,246
Szövettani grade LG vs. HG	0,017	0,199	0,233
Citogenetikai eltérést mutató sejtek %			
% medián alatt vs. medián felett (=12,00)	0,712	0,115	0,415
% átlag alatt vs. átlag felett (=23,22)	0,488	0,133	0,375
UFS csoport I vs. II vs. III	0,002	< 0,001	0,873
alacsony rizikó (I-II) vs. magas rizikó (III)	< 0,001	< 0,001	0,755

EAU rizikócsoportok			
alacsony-közepes-magas-legmagasabb	0,718	0,424	0,254
alacsony vs. közepes	0,555	1,000	0,334
közepes vs. magas	0,474	0,213	0,056
magas vs. legmagasabb	0,805	0,466	0,757
alacsony+közepes vs. magas+legmagasabb	0,359	0,147	0,067
EORTC rizikócsoportok			
alacsony-közepes-magas-legmagasabb	0,738	0,331	0,735
alacsony vs. közepes	0,693	0,079	0,450
közepes vs. magas	0,524	0,583	0,720
magas vs. legmagasabb	0,577	0,622	0,784
alacsony+közepes vs. magas+legmagasabb	0,438	0,691	0,398
AUA rizikócsoportok			
alacsony-közepes-magas	0,057	0,283	0,277
alacsony vs. közepes	0,223	0,462	0,154
magas vs. legmagasabb	0,086	0,246	0,292
alacsony+közepes vs. magas	0,026	0,134	0,594

6. táblázat. Demográfiai és betegkövetési adatok.

Rövidítések: PFS= progressziómentes túlélés, TTP= progresszióig eltelt idő, RFS= recidíva-mentes túlélés, MIBC= izominvazív hólyagrák, NMIBC= nem izominvazív hólyagrák, G1= grade 1, G2= grade 2, G3= grade 3, LG= low grade, HG= high grade, UFS= UroVysion FISH rizikóskála

	n	Nem férfi/ nő	Kor év medián/ átlag	PFS hónap medián/ átlag	TTP hónap medián/ átlag	RFS hónap medián/ átlag
Jóindulatú szövet	12	2/10	61,00 / 62,21 (49-78)			
MIBC	18	8/10	64,50 / 64,67 (49-81)			
NMIBC	57	23/34	64,00 / 65,04 (42-91)	74,69 / 75,60 (2-156)	74,69 / 75,60 (2-156)	31,00 / 44,82 (2-148)
Ta	28	11/17	62,00 / 62,43 (43-84)	98,06 / 84,06 (4-156)	98,06 / 84,06 (4-156)	41,11 / 49,85 (4-129)
T1	29	12/17	70,00 / 67,55 (42-91)	64,73 / 67,44 (2-148)	64,73 / 67,44 (2-148)	29,19 / 39,96 (2-148)
G1	11	3/8	63,00 / 66,09 (43-84)	92,37 / 85,93 (4-148)	92,37 / 85,93 (4-148)	12,00 / 31,91 (4-148)
G2	34	15/19	62,50 / 63,44 (44-84)	81,07 / 80,21 (6-156)	81,07 / 80,21 (6-156)	43,39 / 54,51 (4-136)
G3	12	5/7	72,00 / 68,58 (42-91)	46,20 / 53,09 (2-136)	46,20 / 53,09 (2-136)	23,60 / 29,18 (2-91)

LG	28	9/19	62,50 / 64,46 (43-84)	103,0 / 88,62 (4-156)	103,0 / 88,62 (4-156)	22,32 / 44,52 (4-148)
HG	29	14/15	68,00 / 65,59 (42-91)	59,83 / 63,03 (2-136)	59,83 / 63,03 (2-136)	38,00 / 45,11 (2-136)
UFS I	7	2/5	62,00 / 60,29 (53-65)	92,37 / 72,70 (16-116)	92,37 / 72,70 (16-116)	25,64 / 38,57 (6-92)
UFS II	34	16/18	66,00 / 65,85 (43-91)	99,47 / 88,83 (4-156)	99,47 / 88,83 (4-156)	34,50 / 48,99 (4-148)
UFS III	16	5/11	65,50 / 65,38 (42-79)	48,44 / 48,76 (2-136)	48,44 / 48,76 (2-136)	31,35 / 38,68 (2- 136)
UFS (I-II) alacsony rizikó	41	18/23	64,00 / 64,90 (43-91)	95,00 / 86,08 (4-156)	95,00 / 86,08 (4-156)	31,00 / 47,21 (4-148)
UFS (III) magas rizikó	16	5/11	65,50 / 65,38 (42-79)	48,44 / 48,76 (2-136)	48,44 / 48,76 (2-136)	31,35 / 38,68 (2- 136)

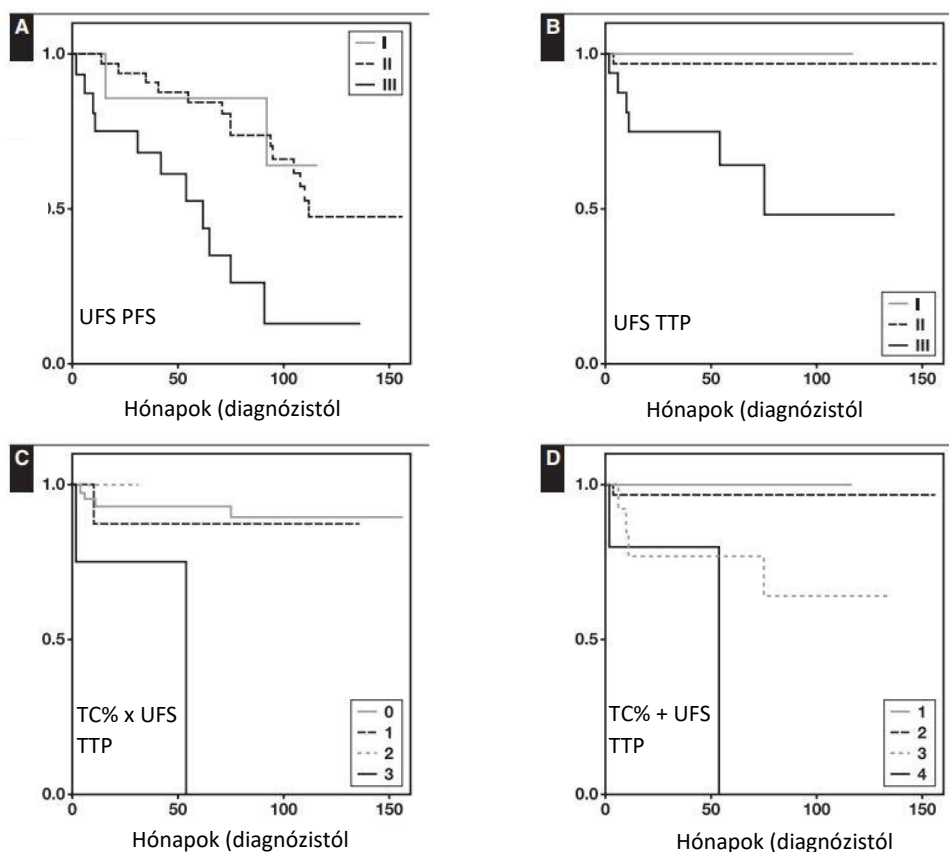
7. táblázat. A progresszió rizikóját meghatározó skálák multivariáns analízise nem izominvazív hólyagtumorok esetében.

Az UFS nemzetközi irányelvek által ajánlott rizikóbecslő skálákhoz való hozzáadott prognosztikai értékének vizsgálatához a Harrell-féle C-statisztikát alkalmaztuk 4 modellben (1: EORTC, 2: EORTC+UFS, 3: AUA, 4: AUA+UFS). Jelmagyarázat: Tumor típus^a: primer vagy recidív tumor, alacsony^b: alacsony rizikóval rendelkező csoport, közepes^c: közepes rizikóval rendelkező csoport, magas^d: magas rizikóval rendelkező csoport AUA és UFS esetében / magas és legmagasabb rizikóval rendelkező csoportok EORTC esetében.

Rövidítések: PFS= progressziómentes túlélés, TTP= progresszióig eltelt idő, CI= konfidencia intervallum, HR= relatív hazard, EORTC= Európai Rákkutató és Terápiás Szervezet, AUA= Amerikai Urológus Társaság, UFS= UroVysion FISH rizikóskála.

végpont		változó	HR CI 95%	p-érték	c-index
Model 1					
	PFS			0,03	0,662
		Beteg életkora az elsővonalbeli kezelés idején	1,059 (1,017-1,103)	0,005	
		Tumor típus ^a	1,678 (0,373-7,563)	0,500	
		EORTC alacsony ^b +közepes ^c	referencia	1	
		EORTC magas ^d	1,035 (0,458-2,337)	0,934	
	TTP			0,1	0,743
		Beteg életkora az elsővonalbeli kezelés idején	1,003 (0,936-1,076)	0,928	

		Tumor típus ^a	8,482 (1,175-61,251)	0,034	
		EORTC alacsony ^b +közepes ^c	referencia	1	
		EORTC magas ^d	2,388 (0,386-14,762)	0,349	
Model 2					
	PFS			<0,001	0,762
		Beteg életkora az elsővonalbeli kezelés idején	1,091 (1,037-1,148)	<0,001	
		Tumor típus ^a	1,619 (0,354-7,409)	0,535	
		EORTC alacsony ^b +közepes ^c	referencia	1	
		EORTC magas ^d	0,635 (0,266-1,515)	0,306	
		UFS alacsony ^b	referencia	1	
		UFS magas ^d	6,616 (2,545-17,202)	<0,001	
	TTP			<0,001	0,902
		Beteg életkora az elsővonalbeli kezelés idején	1,030 (0,930-1,141)	0,570	
		Tumor típus ^a	6,686 (0,886-50,485)	0,065	
		EORTC alacsony ^b +közepes ^c	referencia	1	
		EORTC magas ^d	1,180 (0,182-7,635)	0,862	
		UFS alacsony ^b	referencia	1	
		UFS magas ^d	22,310 (2,456-202,649)	0,006	
Model 3					
	PFS			0,002	0,705
		Beteg életkora az elsővonalbeli kezelés idején	1,065 (1,023-1,108)	0,002	
		Tumor típus ^a	2,312 (0,513-10,423)	0,275	
		AUA alacsony ^b +közepes ^c	referencia	1	
		AUA magas ^d	2,752 (1,236-6,124)	0,013	
	TTP			0,04	0,791
		Beteg életkora az elsővonalbeli kezelés idején	1,011 (0,942-1,085)	0,4181	
		Tumor típus ^a	7,900 (1,417-44,035)	0,2748	
		AUA alacsony ^b +közepes ^c	referencia	1	
		AUA magas ^d	4,296 (0,792-23,305)	0,0327	
Model 4					
	PFS			<0,001	0,759
		Beteg életkora az elsővonalbeli kezelés idején	1,080 (1,031-1,131)	0,001	
		Tumor típus ^a	2,054 (0,458-9,206)	0,347	
		AUA alacsony ^b +közepes ^c	referencia	1	
		AUA magas ^d	1,836 (0,781-4,321)	0,164	
		UFS alacsony ^b	referencia	1	
		UFS magas ^d	4,222 (1,689-10,553)	0,002	
	TTP			<0,001	0,908
		Beteg életkora az elsővonalbeli kezelés idején	1,030 (0,931-1,139)	0,569	
		Tumor típus ^a	5,784 (0,977-34,254)	0,053	
		AUA alacsony ^b +közepes ^c	referencia	1	
		AUA magas ^d	1,244 (0,196-7,894)	0,817	
		UFS alacsony ^b	referencia	1	
		UFS magas ^d	20,779 (2,015-214,277)	0,011	



5. ábra. A nem izominvazív húgyhólyagrákok progressziójának vizsgálata Kaplan-Meier túlélési görbékkel.

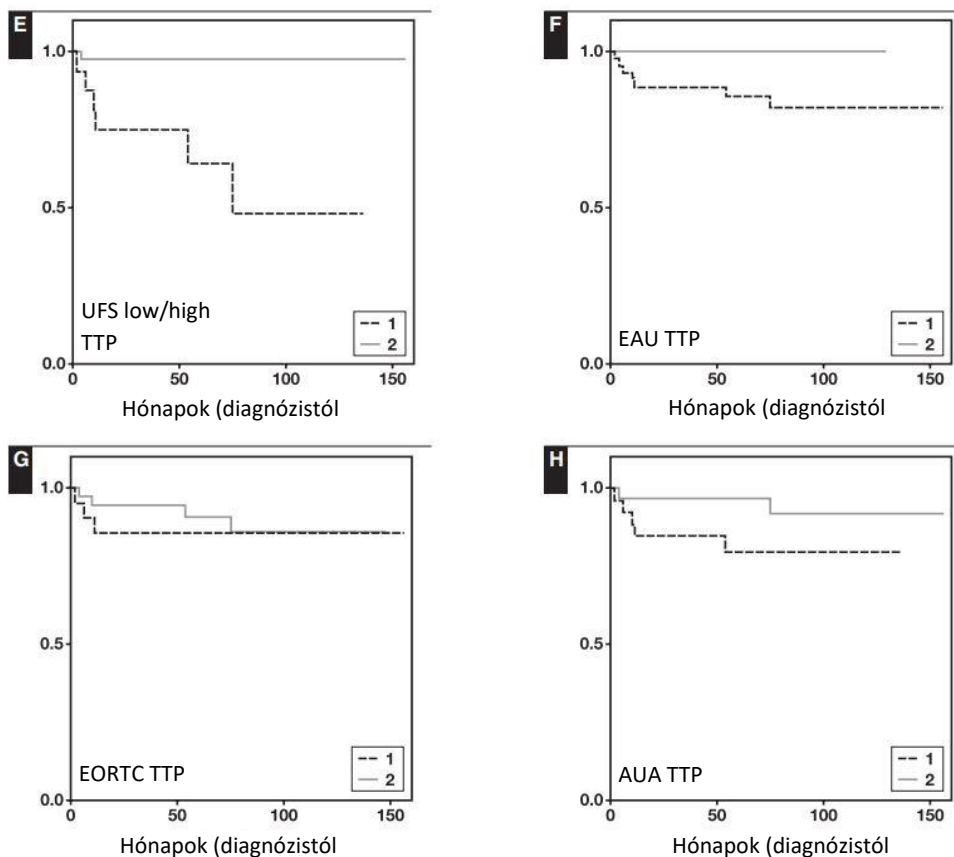
A túlélési görbék közti különbséget log rank teszttel határoztuk meg.

A: PFS a UroVysion FISH rizikóskála al csoportjai szerint (I-III).

B: TTP a UroVysion FISH rizikóskála al csoportjai szerint (I-III).

C: TTP a citogenetikai abnormalitást mutató sejtek százalékos aránya és a UroVysion FISH rizikóskála al csoport szorzáson alapuló kombinációja szerint.

D: TTP a citogenetikai abnormalitást mutató sejtek százalékos aránya és a UroVysion FISH rizikóskála al csoport összeadáson alapuló kombinációja szerint.



5. ábra. A nem izominvazív húgyhólyagrákok progressziójának vizsgálata Kaplan-Meier túlélési görbékkel.

E: TTP a UroVysion FISH rizikóskála alacsony (I-II) és magas (III) kockázatú alcsoportjai szerint.

F: TTP az alacsony- és közepes-, illetve a magas- és legmagasabb kockázatú EAU alcsoportok szerint.

G: TTP az alacsony- és közepes-, illetve a magas- és legmagasabb kockázatú EORTC alcsoportok szerint.

H: TTP az alacsony- és közepes-, illetve a magas kockázatú AUA alcsoportok szerint.

Rövidítések: PFS= progressziómentes túlélés, TTP= progresszióig eltelt idő, EAU= Európai Urológus Társaság, EORTC= Európai Rákkutató és Terápiás Szervezet, AUA= Amerikai Urológus Társaság, TC%: tumorsejt százalék, a UroVysion kritériumainak megfelelő citogenetikai abnormalitást mutató sejtek százalékos aránya (Kocsmár I, Pajor G, Gyöngyösi B et al., Am J Clin Pathol, 2020)¹⁴⁶

A követési idő 6-156 hónap között változott (a medián követési idő 92 hónap volt). Az átlagéletkor a diagnózis felállításakor 65,04 év volt (tartomány: 42-91). A kohorszban magas, nem húgyhólyagrakkal kapcsolatos halálozás volt megfigyelhető az alacsony várható élettartam miatt (Magyarországon 2005-ben 65 éves korban férfiak esetében 13,1 év, nők esetében 16,9 év volt a várható élettartam.¹⁵¹ Ennek megfelelően a követési időszak alatt 4 beteg halt meg hólyagrakban (4 alacsonyan differenciált tumorra rendelkező beteg) és 21 beteg más betegségben. Az egyetlen Ta stádiumú húgyhólyagrakos beteg, akinek a tumora progressziót mutatott, T2 stádiumúvá progrediált. A vizsgált paraméterek közül a recidíva-mentes túléléssel (RFS) kizárólag a G1 szövettani grade mutatott szignifikáns összefüggést, mégpedig negatív jellegűt ($p=0,003$, 5. táblázat).

IV./1.1. A vizelet FISH és a szövettani vizsgálattal kapott eredmények összehasonlítása

A szövettani grade és a húgyhólyagtumorerő stádiumának vizsgálatával kapott eredmények az 2. táblázatban láthatóak. A Urovysion teszt gyári kritériumai alapján kóros jelminiatú sejtek aránya mind a szövettani grade, mind a patológiai stádium szerint szignifikánsan emelkedett (G1-G2: $p=0,041$, G2-G3: $p=0,017$ és G1-G3: $p=0,001$; továbbá LG-HG: $p<0,001$, illetve; Ta-T2: $p=0,002$). A különbség nem volt szignifikáns a Ta-T1 és T1-T2 összehasonlításban (Mann-Whitney U teszt). Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a szövettani grade és az UFS között mind a G1/G2/G3, mind az LG/HG osztályozás tekintetében (G1/G2/G3 vs. UFS alacsony-/UFS magas rizikó: $p<0,001$; Fisher egzakt teszt, LG/HG vs. UFS alacsony-/UFS magas rizikó: $p<0,001$; Khi-négyzet próba). A tumorstádiumok szintén szignifikáns és pozitív korrelációt mutattak az UFS-sal (Ta/T1/T2 vs. UFS alacsony-/UFS magas rizikó $p<0,001$; Khi-négyzet próba). Ennek megfelelően az UFS szignifikánsan magasabb volt izominvazív tumorok esetében (T2), mint a nem izominvazív tumoroknál (Ta/T1) (Fisher egzakt teszt, $p<0,001$) továbbá szintén magasabb volt a T1 stádiumú daganatokban, mint a Ta tumorokban (Fisher egzakt teszt, $p=0,001$).

IV./1.2. A UroVysion FISH rizikóskála és a citogenetikai eltérést mutató sejtek prognosztikai értéke

Az NMIBC tumorok esetében a PFS és TTP szignifikánsan különböző volt a különböző rizikóval rendelkező UFS csoportok túlélési görbéi között (UFS-I-II-III), azonban RFS tekintetében nem volt kimutatható különbség a csoportok között (log-rank teszt). A PFS és a TTP szignifikánsan rövidebb volt a magas rizikóval rendelkező UFS csoport esetében, mint az alacsonyabb rizikóval rendelkező csoportoknál (UFS I-II) (5. táblázat, 5. A-B, E ábra). A többváltozós Cox-analízist megelőző khi-négyzet teszt nem mutatott szignifikáns összefüggést az érintett változók között. Az UFS rizikócsoportok a TURBT minták szövettani elemzésével kapott jellemzőktől (patológiai stádium, szövettani grade) a PFS és a TTP független prognosztikai faktorának bizonyultak (4. táblázat). Mind a Kaplan-Meier-, mind a többváltozós Cox-analízis a magas rizikóval rendelkező UFS csoportban (UFS III) lévő esetek progressziójának szignifikánsan fokozott kockázatát mutatták PFS és TTP esetében (4. táblázat). A UroVysion diagnosztikus kritériumainak megfelelő citogenetikai abnormalitást mutató sejtek százalékos aránya folytonos változóként szignifikáns fordított korrelációt mutatott TTP-vel, azonban ezen változó átlag, illetve medián szerint dichotomizálását követően nem volt kimutatható összefüggés az UFS rizikócsoportok és a citogenetikai abnormalitást mutató sejtek aránya között TTP tekintetében (4. és 5. táblázat). A továbbiakban megpróbáltuk a citogenetikai abnormalitást mutató sejtek százalékos értékét és az UFS rizikócsoportot (mint a citogenetikai elváltozások jellemzésére szolgáló két különböző megközelítést) egyetlen prognosztikai indexbe foglalni. Azonban sem a szorzáson alapuló kombinációjuk, sem a két változó összeadásán alapuló kombináció nem volt képes felülmúlni az eredeti UroVysion FISH Score prognózis szerinti differenciáló képességét (5. C-D ábra).

IV./1.3. A UroVysion FISH rizikóskála prognosztikai értékének összehasonlítása a nemzetközi irányelvek által ajánlott rizikóbecslő táblákkal

Az EAU, az EORTC és az AUA rizikóbecslő táblái szerint meghatározott rizikócsoportok között Kaplan-Meier analízissel vizsgálva nem volt kimutatható szignifikáns különbség a PFS, a TTP és az RFS tekintetében (5. táblázat). Amennyiben az AUA magas és közepes rizikóval rendelkező csoportjai összevonásra kerültek,

esetükben szignifikánsan rövidebb PFS volt megfigyelhető az alacsony rizikóval rendelkező csoporttal szemben (5. táblázat). Az UFS a nemzetközi irányelvek által ajánlott rizikótábláihoz való hozzáadott prognosztikai értékét C-statisztika segítségével vizsgáltuk olyan módon, hogy meghatároztuk külön az EORTC és AUA rizikótáblái esetében a C-statisztikát többváltozós modellben, majd a modellhez az UFS új változóként való hozzáadását követően ezen értékeket újra kiszámítottuk. Az UFS új változóként való hozzáadása a többváltozós modellekhez a C-statisztika növekedését vonta maga után mind a PFS, mind a TTP tekintetében, miközben mind a két esetben független prognosztikai faktor maradt (7. táblázat).

IV./1.4. A UroVysion FISH rizikóskála teljesítménye az izominvazív hólyagtumороk kimutatásában

Az UFS NMIBC és MIBC tumorok közötti differenciáló képességének vizsgálatakor a progresszió negatív és pozitív esetek között korábban meghatározott határértéket alkalmaztuk ($ACCN \geq 3,5$ és/vagy legalább egy sejtben legalább egy kromozómából legalább 6 kópia jelen van). A FISH vizsgálat időpontjában MIBC és NMIBC stádiumban lévő tumorok elkülönítésénél az UFS szenzitivitása 94,44% (95% CI: 72,71%-99,86%), specificitása 71,93% (95% CI: 58,46%-83,03%) volt, míg a PPV 51,52% (95% CI: 40,86%-62,04%) az NPV pedig 97,62% (95% CI: 85,84%-99,64%) volt. Ugyancsak megvizsgáltuk a FISH vizsgálat időpontjában MIBC stádiumban lévő, illetve a követés során izominvazív stádiumba progrediáló NMIBC esetek elkülönítését UFS alapján a progressziót a későbbiekben nem mutató NMIBC tumoroktól, itt a szenzitivitás 92,00% (95% CI: 73,97%-99,02%), a specificitás 80,00% (95% CI: 66,28%-89,97%), a PPV 69,70% (95% CI: 56,63%-80,21%) és az NPV 97,62% (95% CI: 84,01%-98,70%) volt.

IV./2. A 17-es kromoszóma poliszómia, a HER2 és a p53 státusz

prognosztikai értékének vizsgálata

A betegek demográfiai adatait, a reszekált szövetek patológiai vizsgálatának eredményeit és a tumorok nemzetközi irányelvek szerinti rizikóbesorolását az 8. és 9. táblázat tartalmazza. Az NMIBC-betegek életkori megoszlása összhangban volt az irodalmi adatokkal.⁷⁶

8. táblázat. A betegek demográfiai adatai és a reszekált szövetek patológiai vizsgálatának eredményei.

Rövidítések: BCG= Bacillus Calmette-Guerin

<i>Demográfiai adatok</i>		
Életkor	átlag	intervallum
	65,84	(40-91)
Nem	n	%
férfi	46	(51,11)
nő	44	(48,89)
Követési idő hónapokban	medián	intervallum
	77	(2-158)
Intravezikális instilláció (BCG/kemoterápia)	n	%
igen	61	(67,78)
nem	22	(24,44)
nincs adat	7	(7,78)
<i>Tumorszövet jellemzői</i>		
	n	%
Tumor típus		
primer	70	(77,78)
recidív	20	(22,22)
Stádium		
pTa	42	(46,67)
pT1	47	(52,22)
pTis	1	(1,11)

Szövetteni grade	
1	20 (22,22)
2	52 (57,78)
3	18 (20,00)
low grade	47 (52,22)
high grade	43 (47,78)
Multiplicitás	
szoliter	79 (87,78)
multiplex	11 (12,22)
Tumor méret	
< 3 cm	68 (75,56)
≥ 3 cm	22 (24,44)
Recidíva a követés során	
igen	54 (60,00)
nem	36 (40,00)
Progresszió izominvazív tumorrá a követés során	
nem	76 (84,44)
igen	14 (15,56)

9. táblázat. A betegek progressziós rizikócsoportok szerinti beosztása.

Rövidítések: EAU, European Association of Urology; EORTC, European Organisation for Research and Treatment of Cancer; AUA, American Urological Association.

A betegek progressziós rizikócsoportok szerinti beosztása	
EAU rizikócsoportok a WHO 1973 grade alapján	
Alacsony rizikó	8 (8,89)
Közepes rizikó	50 (55,56)
Magas rizikó	31 (34,44)
Nagyon magas rizikó	1 (1,11)

EAU rizikócsoporthok a WHO 2004/2016 grade alapján	
Alacsony rizikó	25 (27,78)
Közepes rizikó	29 (32,22)
Magas rizikó	35 (38,89)
Nagyon magas rizikó	1 (1,11)
EORTC rizikócsoporthok	
Progressziós score=0	20 (22,22)
Progressziós score=2-6	43 (47,78)
Progressziós score=7-13	24 (26,67)
Progressziós score=14-23	2 (2,22)
AUA rizikócsoporthok	
Alacsony rizikó	13 (14,44)
Közepes rizikó	39 (43,33)
Magas rizikó	38 (42,22)

IV./2.1. A 17-es poliszómia, a HER2 fehérjeexpresszió és a HER2 génamplifikáció vizsgálata

A kontroll esetek egyike sem volt HER2-pozitív, továbbá esetükben nem volt megfigyelhető sem a *HER2* amplifikációja és a 17-es kromoszóma poliszómiája sem. A 3+ HER2 overexpresszióval rendelkező NMIBC esetek szignifikánsan magasabb szövettani grádussal és stádiummal rendelkeztek, valamint esetükben alacsonyabb volt a kiújulás aránya, mint a HER2 expresszióval nem rendelkező vagy alacsony HER2 expressziójú tumoroknál. A heterogén HER2-expresszió magasabb szövettani grádussal járt együtt. A hét *HER2*-amplifikált NMIBC (mind T1 és HG/G3) esetében szignifikánsan magasabb szövettani grade és patológiai stádium volt megfigyelhető, mint a nem amplifikált esetekben. A 28 poliszómás (köztük kilenc erős poliszómiás) eset szignifikánsan magasabb szövettani grádussal és patológiai stádiummal rendelkezett a nem poliszómás daganatoknál. Továbbá a poliszómiás esetekben szignifikánsan magasabb volt a progresszió aránya, mint a nem poliszómiás daganatok esetében. Az elemzett tumorok klinikopatológiai jellemzői, HER2-overexpressziója, *HER2*-amplifikációja és 17-es poliszómia státusza közötti összefüggéseket a 4. ábra, a 10. és 11. táblázat részletezi.

10. táblázat. A HER2/Chr17 FISH vizsgálat eredményeinek és a tumorok klinikopatológiai jellemzőinek összehasonlítása.

A táblázatban látható statisztikai analízisek Fisher-egzakt teszt használatával készültek.

Jelmagyarázat: Stádium*: Ta vs. T1 tumorok; Szöveti grade**: grade 1/2 vs. grade 3.

Rövidítések: FISH= fluoreszcens *in situ* hibridizáció, Chr17: 17-es kromoszóma,

CI (OR)=az esélyhányados konfidencia-intervalluma

Tumor jellemzők	HER2 amplifikált n (%)	HER2 nem amplifikált n (%)	P
<i>Tumor típus</i>			
primer	5 (71,43)	65 (78,31)	
recidív	2 (28,57)	18 (21,69)	0,65
	CI (OR)	0,103-7,878	
<i>Stádium*</i>			
pTa	0 (0,00)	42 (50,6)	
pT1	7 (100,00)	40 (48,19)	0,01
pTis	0 (0,00)	1 (1,2)	
	CI (OR)	0,000-0,718	
<i>Szöveti grade**</i>			
1	0 (0,00)	20 (24,10)	
2	0 (0,00)	52 (62,65)	< 0,001
3	7 (100,00)	11	
	CI (OR)	0,000-0,129	
Low grade	0 (0,00)	47 (56,63)	
High grade	7 (100,00)	36 (43,37)	0,004
	CI (OR)	0,000-0,579	

<i>Tumor méret</i>																											
< 3 cm	5	63																									
	(71,43)	(75,90)																									
≥ 3 cm	2	20	1																								
	(28,57)	(24,1)																									
	CI (OR)	0,119-8,965																									
<i>Multiplicitás</i>																											
szoliter	7	72																									
	(100,00)	(86,75)																									
multiplex	0	11	0,59																								
	(0,00)	(13,25)																									
	CI (OR)	0,190-végtelen																									
<i>Recidíva</i>																											
igen	3	51																									
	(42,86)	(61,45)																									
nem	4	32	0,43																								
	(57,14)	(38,55)																									
	CI (OR)	0,065-3,004																									
<i>Progresszió</i>																											
igen	3	11																									
	(42,86)	(13,25)																									
nem	4	72	0,07																								
	(57,14)	(86,75)																									
	CI (OR)	0,618-32,735																									
<table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Tumor jellemzők</th> <th style="text-align: center;">Chr17 poliszómia</th> <th style="text-align: center;">Chr17 poliszómia nélkül</th> <th style="text-align: center;">p</th> <th style="text-align: center;">Chr17 erős poliszómia</th> <th style="text-align: center;">Chr17 erős poliszómia nélkül</th> <th style="text-align: center;">p</th> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">n</td> <td style="text-align: center;">n</td> <td></td> <td style="text-align: center;">n</td> <td style="text-align: center;">n</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">(%)</td> <td style="text-align: center;">(%)</td> <td></td> <td style="text-align: center;">(%)</td> <td style="text-align: center;">(%)</td> <td></td> </tr> </thead> </table>							Tumor jellemzők	Chr17 poliszómia	Chr17 poliszómia nélkül	p	Chr17 erős poliszómia	Chr17 erős poliszómia nélkül	p		n	n		n	n			(%)	(%)		(%)	(%)	
Tumor jellemzők	Chr17 poliszómia	Chr17 poliszómia nélkül	p	Chr17 erős poliszómia	Chr17 erős poliszómia nélkül	p																					
	n	n		n	n																						
	(%)	(%)		(%)	(%)																						
<i>Tumor típus</i>																											
primer	23	47		8	19																						
	(82,14)	(75,81)		(88,89)	(23,46)																						
recidív	5	15	0,59	1	62	< 0,001																					
	(17,86)	(24,19)		(11,11)	(76,54)																						
	CI (OR)	0,434-5,787		CI (OR)	3,047- 1168,346																						
<i>Stádium*</i>																											
pTa	6	36		1	41																						
	(21,43)	(58,06)		(11,11)	(50,62)																						
pT1	21	26	0,002	7	40	0,062																					
	(75,00)	(41,94)		(77,78)	(49,38)																						
pTis	1	0		1	0																						
	(3,57)	(0,00)		(11,11)	(0,00)																						
	CI (OR)	0,061-0,634		CI (OR)	0,003- 1,185																						

<i>Szöveti grade**</i>						
1	0	20		0	20	
	(0,00)	(32,26)		(0,00)	(24,69)	
2	15	37	< 0,001	3	49	0,002
	(53,57)	(59,68)		(33,33)	(60,49)	
3	13	5		6	12	
	(46,43)	(8,06)		(66,67)	(14,81)	
	CI (OR)	0,025-0,371		CI (OR)	0,013-0,491	
Low grade	4	43		0	47	
	(14,29)	(69,35)		(0,00)	(58,02)	
High grade	24	19	< 0,001	9	34	< 0,001
	(85,71)	(30,65)		(100,00)	(41,98)	
	CI (OR)	0,017-0,263		CI (OR)	0,000-0,402	
<i>Tumor méret</i>						
< 3 cm	20	48		5	63	
	(71,43)	(77,42)		(55,56)	(77,78)	
≥ 3 cm	8	14	0,6	4	18	0,214
	(28,57)	(22,58)		(44,44)	(22,22)	
	CI (OR)	0,240-2,346		CI (OR)	0,070-2,022	
<i>Multiplicitás</i>						
szoliter	27	52		9	70	
	(96,43)	(83,87)		(100,00)	(86,42)	
multiplex	1	10	0,16	0	11	0,594
	(3,57)	(16,13)		(0,00)	(13,58)	
	CI (OR)	0,665-233,295		CI (OR)	0,264-végtelen	
<i>Recidíva</i>						
igen	15	39		5	49	
	(53,57)	(62,90)		(55,56)	(60,49)	
nem	13	23	0,49	4	32	1
	(46,43)	(37,10)		(44,44)	(39,51)	
	CI (OR)	0,251-1,864		CI (OR)	0,162-4,449	
<i>Progresszió</i>						
igen	10	4		5	9	
	(35,71)	(6,45)		(55,56)	(11,11)	
nem	18	58	< 0,001	4	72	0,004
	(64,29)	(93,55)		(44,44)	(88,89)	
	CI (OR)	1,968-38,464		CI (OR)	1,724- 58,357	

11. táblázat. A HER2 immunhisztokémiai eredmények és a daganatok klinikopatológiai jellemzőinek összefüggése

Rövidítések, jelölések: IHC=immunhisztokémia; † HER2 IHC 0/1+/2+ vs. HER2 IHC 3+; *Ta vs. T1 tumorok; # Grade 1/2 vs. Grade 3; CI (OR)=az esélyhányados konfidencia-

intervalluma

† Tumor jellemzők	HER2 IHC 0	HER2 IHC 1+	HER2 IHC 2+	HER2 IHC 3+	P	CI (OR)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		Alsó	Felső
<i>Tumor típus</i>							
primer	21 (70,00)	14 (77,78)	27 (81,82)	8 (88,89)			
recidív	9 (30,00)	4 (22,22)	6 (18,18)	1 (11,11)	0,678	0,009	3,413
<i>Stádium</i>							
pTa	15 (50,00)	8 (44,44)	18 (54,55)	1 (11,11)			
pT1	15 (50,00)	10 (55,56)	14 (42,42)	8 (88,89)	0,032*	1,027	381,370
pTis	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,03)	0 (00,0)			
<i>Szövetteni grade</i>							
1	10 (33,33)	4 (22,22)	6 (18,18)	0 (00,0)			
2	16 (53,33)	12 (66,67)	22 (66,67)	2 (22,22)	<0,001#	3,447	231,954
3	4 (13,33)	2 (11,11)	5 (15,15)	7 (77,78)			
Low grade	19 (63,33)	14 (77,78)	14 (42,42)	0 (00,0)			
High grade	11 (36,67)	4 (22,22)	19 (57,58)	9 (100,00)	<0,001	2,485	végtelen
<i>Tumor méret</i>							
<3 cm	25 (83,33)	14 (77,78)	23 (69,70)	6 (66,67)			
≥3 cm	5 (16,67)	4 (22,22)	10 (30,30)	3 (33,33)	0,683	0,240	8,506
<i>Multiplicitás</i>							
szoliter	27 (90,00)	15 (83,33)	28 (84,85)	9 (100,00)			
multiplex	3 (10,00)	3 (16,67)	5 (15,15)	0 (0,00)	0,594	0,000	3,782
<i>Recidíva</i>							
igen	16 (53,33)	14 (77,78)	22 (66,67)	2 (22,22)			
nem	14 (46,67)	4 (22,22)	11 (33,33)	7 (77,78)	0,027	1,077	64,502
<i>Progresszió</i>							
igen	5 (16,67)	1 (5,56)	6 (18,18)	2 (22,22)			
nem	25 (83,33)	17 (94,44)	27 (81,82)	7 (77,78)	0,626	0,099	6,734

Tumor jellemzők	Heterogén HER2 overexpresszió	Nem-heterogén HER2 overexpresszió	p		
	n (%)	n (%)	Alsó	Felső	
<i>Tumor típus</i>					
primer	35 (85,37)	35 (71,43)			
recidív	6 (14,63)	14 (28,57)	0,133	0,73	8,223
<i>Stádium</i>					
pTa	18 (43,90)	24 (48,98)			
pT1	22 (53,66)	25 (51,02)	0,831*	0,339	2,136
pTis	1 (2,44)	0 (0,00)			
<i>Szöveti grade</i>					
1	6 (14,63)	14 (28,57)			
2	26 (63,41)	26 (53,06)	0,793#	0,249	2,579
3	9 (21,95)	9 (18,37)			
Low grade	14 (34,15)	33 (67,35)			
High grade	27 (65,85)	16 (32,65)	0,003	0,095	0,659
<i>Tumor méret</i>					
<3 cm	28 (68,29)	40 (81,63)			
≥3 cm	13 (31,71)	9 (18,37)	0,218	0,16	1,431
<i>Multiplicitás</i>					
szoliter	36 (87,80)	43 (87,76)			
multiplex	5 (12,20)	6 (12,24)	1	0,234	4,531
<i>Recidíva</i>					
igen	23 (56,10)	31 (63,27)			
nem	18 (43,90)	18 (36,73)	0,523	0,292	1,885
<i>Progresszió</i>					
igen	5 (12,20)	9 (18,37)			
nem	36 (87,80)	40 (81,63)	0,562	0,149	2,293

IV./2.2. A nem izominvazív hólyagrákok potenciális prognosztikai faktorai

Az utánkövetés során (tartomány: 2-158 hónap; medián: 77 hónap) 14 NMIBC eseténél (15,56%) volt megfigyelhető izominvazív betegséggé történő progresszió. Az egyváltozós és többváltozós Cox analízisek eredményeit a 12. és 13. táblázat, az 6. és a 7. ábra mutatja.

12. táblázat. A nem izominvazív hólyagrákok potenciális prognosztikai faktorainak vizsgálata.

A táblázatban látható potenciális prediktor változók vizsgálatához univariáns Cox regressziót használtunk, a végpont az izominvazív tumorrá történő progresszióig eltelt idő volt Rövidítések: HR= relatív hazard; CI: konfidencia intervallum, WHO= Egészségügyi Világszervezet, IHC= immunhisztokémia.

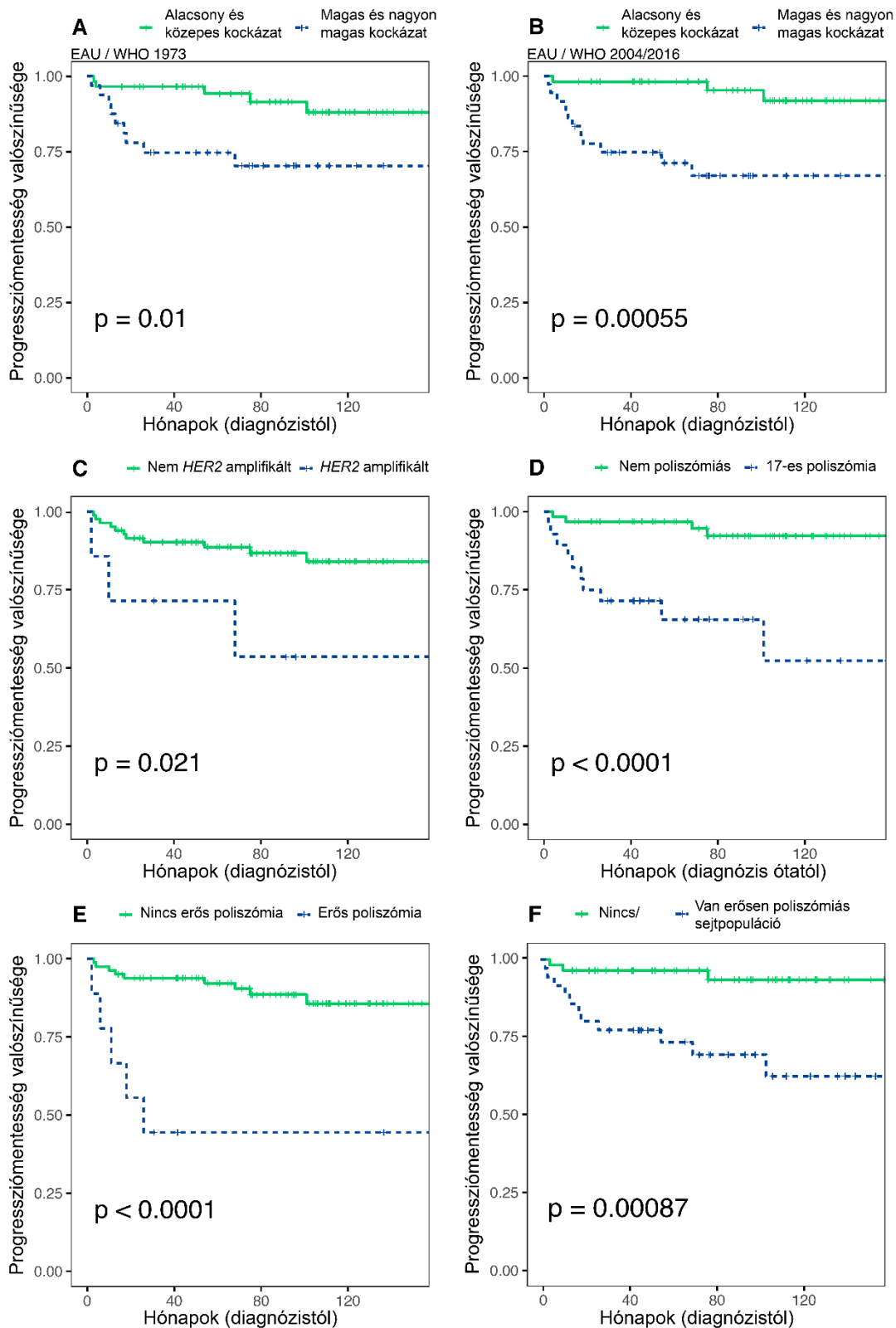
Változó	Kategória	HR	95% CI	P
Életkor években	folytonos változó	1,032	(0,982-1,086)	0,216
Tumor típus	recidív vs. primer (Ref.)	2,691	(0,934-7,760)	0,067
T stádium	Tis, T1 vs. Ta (Ref.)	3,354	(0,921-12,210)	0,066
Szövetteni grade (WHO 1973)	grade 3 vs. grade 1-2 (Ref.)	3,619	(1,248-10,490)	0,018
Szövetteni grade (WHO 2004/2016)	high grade vs. low grade (Ref.)	5,243	(1,441-19,070)	0,012
Tumor méret	≥ 3 cm vs. < 3 cm (Ref.)	0,791	(0,221-2,839)	0,719
HER2 expresszió	3+ vs. 1+ / 2+ / 0 (Ref.)	1,727	(0,386-7,727)	0,475
HER2 expresszió heterogenitás	heterogén vs. nem heterogén (Ref.)	0,667	(0,223-1,992)	0,468
HER2 génamplifikáció	amplifikált vs. nem amplifikált (Ref.)	4,036	(1,122-14,520)	0,033
17-es kromoszóma poliszómia	≥ 2,25 vs. < 2,25 jel/sejt (Ref.)	7,440	(2,306-24,000)	< 0,001
17-es kromoszóma erős poliszómia	≥ 3,45 vs. < 3,45 jel/sejt (Ref.)	7,505	(2,478-22,730)	< 0,001
Erős poliszómiás sejtpopuláció	jelen van vs. nincs jelen (Ref.)	6,577	(1,832-23,610)	0,004
p53 IHC státusz	1-49% vs. 0% / 50-100%	2,427	(0,7826-7,524)	0,125

13. táblázat. A nem izominvazív hólyagrákok potenciális prognosztikai faktorainak vizsgálata.

A táblázatban feltüntetett potenciális prediktor változók vizsgálatához multivariáns Cox regressziót használtunk, a végpont az izominvazív tumorra történő progresszióig eltelt idő volt. Rövidítések: HR= relatív hazard; CI: konfidencia intervallum, WHO= Egészségügyi Világszervezet, IHC= immunhisztokémia

Változó	Kategória	HR	95% CI	P
				0,010
Életkor években	folytonos változó	1,03462	(0,980-1,092)	0,217
Szövetteni grade (WHO 2004/2016)	high grade vs. low grade (Ref.)	4,27592	(1,111-16,457)	0,035
<i>HER2</i> génamplifikáció	amplifikált vs. nem amplifikált (Ref.)	2,37480	(0,615-9,174)	0,210
				0,001
Életkor években	folytonos változó	1,042	(0,983-1,105)	0,169
Szövetteni grade (WHO 2004/2016)	high grade vs. low grade (Ref.)	2,411	(0,574-10,121)	0,229
17-es kromoszóma poliszómia	≥ 2,25 vs. < 2,25 jel/sejt (Ref.)	5,139	(1,391-18,983)	0,014
				0,003
Életkor években	folytonos változó	1,02938	(0,971-1,091)	0,331
Szövetteni grade (WHO 2004/2016)	high grade vs. low grade (Ref.)	3,35917	(0,828-13,632)	0,090
17-es kromoszóma erős poliszómia	≥ 3,45 vs. < 3,45 jel/sejt (Ref.)	4,01119	(1,206-13,339)	0,024

Életkor években	folytonos változó	1,051	(0,991-1,114)	0,001
Szövettani grade (WHO 2004/2016)	high grade vs. low grade (Ref.)	2,944	(0,766-11,322)	0,116
Erős poliszómiás sejtpopuláció	jelen van vs. nincs jelen (Ref.)	5,403	(1,004-12,259)	0,015
				0,070
Életkor években	folytonos változó	1,035	(0,981-1,093)	0,203
Szövettani grade (WHO 1973)	grade 3 vs. grade 1-2 (Ref.)	2,620	(0,686-10,012)	0,159
<i>HER2</i> génamplifikáció	amplifikált vs. nem amplifikált (Ref.)	2,045	(0,399-10,474)	0,391
				0,002
Életkor években	folytonos változó	1,040	(0,981-1,103)	0,193
Szövettani grade (WHO 1973)	grade 3 vs. grade 1-2 (Ref.)	1,467	(0,455-4,731)	0,522
17-es kromoszóma poliszómia	$\geq 2,25$ vs. $< 2,25$ jel/sejt (Ref.)	6,433	(1,776-23,307)	0,005
				0,008
Életkor években	folytonos változó	1,029	(0,971-1,091)	0,337
Szövettani grade (WHO 1973)	grade 3 vs. grade 1-2 (Ref.)	1,926	(0,551-6,737)	0,305
17-es kromoszóma erős poliszómia	$\geq 3,45$ vs. $< 3,45$ jel/sejt (Ref.)	5,012	(1,363-18,432)	0,015
				0,002
Életkor években	folytonos változó	1,048	(0,990-1,110)	0,106
Szövettani grade (WHO 1973)	grade 3 vs. grade 1-2 (Ref.)	1,884	(0,620-5,726)	0,264
Erős poliszómiás sejtpopuláció	jelen van vs. nincs jelen (Ref.)	6,179	(1,598-23,894)	0,008



6. ábra. A progresszióig eltelt idő (TTP) vizsgálata Kaplan-Meier túlélési görbékkel nem izominvazív húgyhólyagrákokban. Progresszióként definiáltuk, amennyiben egy

beteg tumora inzominvazív (T2 vagy magasabb stádiumú) tumorként recidívált. A görbék közti különbséget log-rank teszttel számítottuk ki.

A: TTP az alacsony- és közepes-, illetve a magas- és legmagasabb kockázatú EAU 1973 alcsoportok szerint.

B: TTP az alacsony- és közepes-, illetve a magas- és legmagasabb kockázatú EAU 2004/2016 alcsoportok szerint.

C: TTP a *HER2* génamplifikációs státusz szerint.

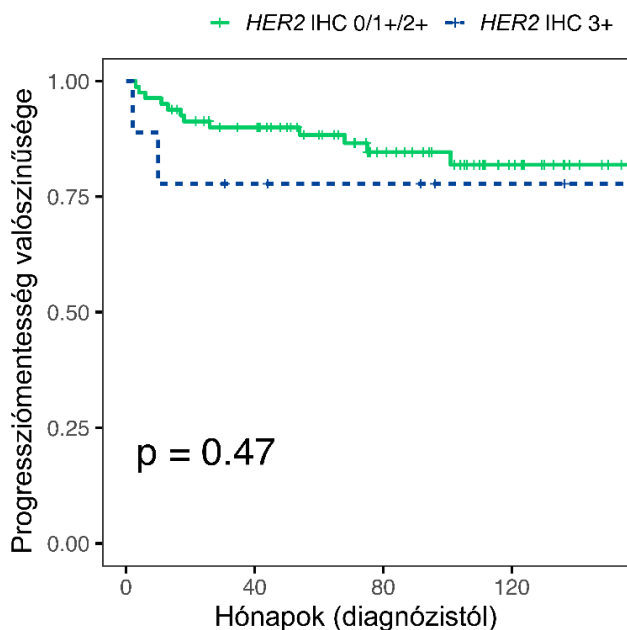
D: TTP a 17-es kromoszóma poliszómia státusza szerint.

E: TTP a 17-es kromoszóma erős poliszómia státusz szerint.

F: TTP a 17-es kromoszóma erős poliszómiáját mutató sejtpopuláció jelenléte szerint.

Rövidítések: TTP= progresszióig eltelt idő (time-to-progression), EAU= Európai Urológus Társaság

(Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G et al., *Cancers (Basel)*, 2022)¹⁵⁰



7. ábra. A HER2 immunhisztokémiai (IHC) státusz progresszióig eltelt időre (TTP) vonatkozó hatásának vizsgálata Kaplan-Meier túlélési görbével nem izominvazív húgyhólyagrákokban.

Progresszióként definiáltuk, amennyiben egy beteg tumora inzominvazív (T2 vagy magasabb stádiumú) tumorként recidívált. A görbék közti különbséget log-rank teszttel számítottuk ki. Rövidítések: TTP= progresszióig eltelt idő (time-to-progression) (Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G et al., *Cancers (Basel)*, 2022)¹⁵⁰

A vizsgált betegcsoportban sem a HER2-overexpresszió intenzitása, sem heterogenitása nem volt összefüggésben a progresszióval (12. táblázat, 7. ábra). Ezzel szemben a *HER2* génamplifikáció, a 17-es poliszómia, az erős poliszómiás státusz vagy a különálló, erős poliszómiát mutató sejtpopuláció jelenléte mind együtt jártak a progresszió magasabb kockázatával (12. táblázat) és rövidebb TTP-vel (6. ábra). A többváltozós elemzésekben a 17-es poliszómia, az erős poliszómia vagy az erős poliszómiás sejtpopuláció jelenléte független prognosztikai faktornak bizonyult mind a WHO 1973-as, mind a WHO 2004/2016-os osztályozási rendszere szerint (13. táblázat).

IV./2.3. A 17-es kromoszóma poliszómia és a *HER2* amplifikáció hozzáadott értéke az EAU és az AUA rizikóbecslő tábláihoz

Az esetek megoszlását az EAU, az EORTC és az AUA prognózis szerinti kockázati csoportjai között az 9. táblázat mutatja. A Cox-analízis eredményeit és a Kaplan-Meier-görbét a 14. táblázat, az 6. ábra és a 8. ábra mutatja be.

14. táblázat. A progressziós kockázati rizikóbecslési rendszerek univariáns Cox-regressziós vizsgálata valamint multivariábilis elemzése a lehetséges prediktív változókkal a progresszióig eltelt idő viszonylatában. HR: hazard ratio; CI: konfidenciaintervallum; korr. C-index: bootstrap-korrigált C-index; EAU: European Association of Urology; EORTC: European Organisation for Research and Treatment of Cancer; AUA: American Urological Association. * A statisztikailag szignifikáns p-értékek félkövérrel vannak jelölve.

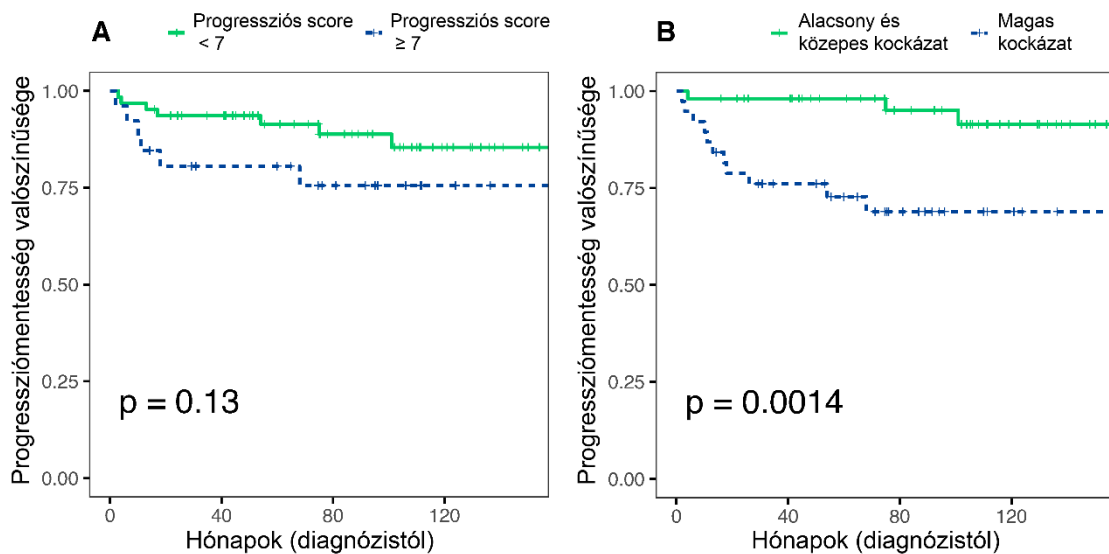
Változó	Kategória	HR	95% CI	P	C-index / korr. C-index
EAU rizikócsoportok a WHO 1973 grade szerint	Magas / nagyon magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	3,814	(1,272-11,430)	0,017*	0,684 / 0,684

<MODEL 1 EAU 1973>			0,030*	0,699 / 0,669
EAU rizikócsoportok a WHO 1973 grade szerint	Magas / nagyon magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	3,167	(0,963-10,416)	0,058
HER2 gén amplifikáció	Amplifikált vs. nem amplifikált (Ref.)	2,046	(0,511-8,192)	0,312
<MODEL 2 EAU 1973>			<0,001*	0,784 / 0,767
EAU rizikócsoportok a WHO 1973 grade szerint	Magas / nagyon magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	1,989	(0,610-6,485)	0,254
17-es poliszómia	≥2,25 vs. <2,25 jel/sejt (Ref.)	5,639	(1,600-19,868)	0,007*
<MODEL 3 EAU 1973>			0,003*	0,725 / 0,704
EAU rizikócsoportok a WHO 1973 grade szerint	Magas / nagyon magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	2,333	(0,673-8,085)	0,182
Erős 17-es poliszómia	≥3,45 vs. <3,45 jel/sejt (Ref.)	4,722	(1,350-16,525)	0,015*
<MODEL 4 EAU 1973>			<0,001*	0,771 / 0,758
EAU rizikócsoportok a WHO 1973 grade szerint	Magas / nagyon magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	2,777	(0,911-8,465)	0,073
Erős poliszómiás sejtpopuláció	Jelen van vs. nincs jelen (Ref.)	5,364	(1,466-19,627)	0,011*

EAU rizikócsoportok a WHO 2004/2016 grade szerint	Magas / nagyon magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	7,086 (1,955-25,680) 0,003*	0,741 / 0,739
<i><MODEL 1 EAU 2004/2016></i>		0,003*	0,755 / 0,735
EAU rizikócsoportok a WHO 2004/2016 grade szerint	Magas / nagyon magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	6,302 (1,654-24,016) 0,007*	
<i>HER2</i> gén amplifikáció	Amplifikált vs. nem amplifikált (Ref.)	1,679 (0,445-6,338) 0,445	
<i><MODEL 2 EAU 2004/2016></i>		<0,001*	0,793 / 0,788
EAU rizikócsoportok a WHO 2004/2016 grade szerint	Magas / nagyon magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	3,800 (0,937-15,410) 0,062	
17-es poliszómia	$\geq 2,25$ vs. $< 2,25$ jel/sejt (Ref.)	4,197 (1,176-14,970) 0,027*	
<i><MODEL 3 EAU 2004/2016></i>		<0,001*	0,789 / 0,781
EAU rizikócsoportok a WHO 2004/2016 grade szerint	Magas / nagyon magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	4,925 (1,256-19,310) 0,022*	
Erős 17-es poliszómia	$\geq 3,45$ vs. $< 3,45$ jel/sejt (Ref.)	3,688 (1,138-11,950) 0,030*	

<MODEL 4 EAU 2004/2016>			<0,001*	0,795 / 0,789
EAU rizikócsoportok a WHO 2004/2016 grade szerint	Magas / nagyon magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	4,691 (1,244-17,690)	0,022*	
Erős poliszómiás sejtpopuláció	Jelen van vs. nincs jelen (Ref.)	4,261 (1,143-15,890)	0,031*	
Az eredeti EAU rizikócsoportok	Magas / nagyon magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	3,636 (1,013-13,060)	0,048*	0,666 / 0,662
EORTC rizikócsoportok	Progressziós score <7 vs. ≥7	2,254 (0,756-6,717)	0,145	0,612 / 0,586
<MODEL 1 EORTC>			0,100	0,629 / 0,574
EORTC rizikócsoportok	Progressziós score <7 vs. ≥7	1,468 (0,379-5,680)	0,579	
HER2 gén amplifikáció	Amplifikált vs. nem amplifikált (Ref.)	3,331 (0,671-16,540)	0,141	
<MODEL 2 EORTC>			0,004*	0,763 / 0,732
EORTC rizikócsoportok	Progressziós score <7 vs. ≥7	1,102 (0,341-3,563)	0,871	
17-es poliszómia	≥2,25 vs. <2,25 jel/sejt (Ref.)	6,670 (1,864-23,870)	0,004*	
<MODEL 3 EORTC>			0,030*	0,643 / 0,602
EORTC rizikócsoportok	Progressziós score <7 vs. ≥7	1,197 (0,314-4,559)	0,792	
Erős 17-es poliszómia	≥3,45 vs. <3,45 jel/sejt (Ref.)	5,940 (1,385-25,475)	0,017*	

<i><MODEL 4 EORTC></i>			0,007*	0,741 / 0,713
EORTC rizikócsoportok	Progressziós score <7 vs. ≥7	1,590 (0,523-4,832)	0,413	
Erős poliszómiás sejtpopuláció	Jelen van vs. nincs jelen (Ref.)	5,579 (1,500-20,742)	0,010*	
AUA rizikócsoportok	Magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	6,252 (1,729-22,610)	0,005*	0,728 / 0,728
<i><MODEL 1 AUA></i>			0,005*	0,745 / 0,724
AUA rizikócsoportok	Magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	5,473 (1,440-20,806)	0,013*	
HER2 gén amplifikáció	Amplifikált vs. nem amplifikált (Ref.)	1,844 (0,489-6,961)	0,366	
<i><MODEL 2 AUA></i>			<0,001*	0,786 / 0,781
AUA rizikócsoportok	Magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	3,123 (0,751-12,980)	0,117	
17-es poliszómia	≥2,25 vs. <2,25 jel/sejt (Ref.)	4,369 (1,195-15,980)	0,026*	
<i><MODEL 3 AUA></i>			<0,001*	0,781 / 0,774
AUA rizikócsoportok	Magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	4,322 (1,108-16,860)	0,035*	
Erős 17-es poliszómia	≥3,45 vs. <3,45 jel/sejt (Ref.)	4,022 (1,245-12,990)	0,020*	
<i><MODEL 4 AUA></i>			<0,001*	0,773 / 0,767
AUA rizikócsoportok	Magas rizikó vs. alacsony / közepes rizikó (Ref.)	3,712 (0,961-14,350)	0,057	
Erős poliszómiás sejtpopuláció	Jelen van vs. nincs jelen (Ref.)	4,080 (1,061-15,700)	0,041*	



8. ábra. A progresszióig eltelt idő vizsgálata Kaplan-Meier túlélési görbékkel nem izominvazív húgyhólyagrákokban. Progresszióként definiáltuk, amennyiben egy beteg tumora izominvazív (T2 vagy magasabb stádiumú) tumorként recidívált. A görbék közti különbséget log-rank teszttel számítottuk ki.

A: TTP a <7 és ≥ 7 EORTC pontszám szerint.alacsony- és közepes-, illetve a magas- és legmagasabb kockázatú EAU 1973 alcsoportok szerint.

B: TTP az alacsony- és közepes-, illetve a magas kockázatú AUA alcsoportok szerint.

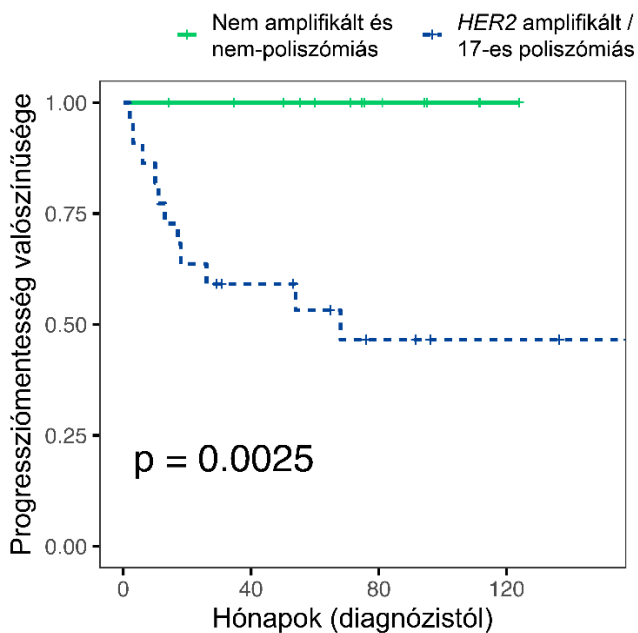
Rövidítések: TTP= progresszióig eltelt idő (time-to-progression), EORTC= Európai

Rákkutató és Terápiás Szervezet, AUA= Amerikai Urológus Társaság

(Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G et al., *Cancers (Basel)*, 2022)¹⁵⁰

Mind az eredeti, mind a frissített (az 1973-as vagy a 2004/2016-os WHO-besorolást használó) EAU rizikóbecslés szignifikáns összefüggést mutatott az izominvazív tumorra történő progresszióval, azonban a frissített EAU kockázati besorolás jobbnak bizonyult a TTP előrejelzésében (c-index = 0,666 vs. 0,684/EAU WHO 1973/ és 0,741/EAU WHO 2004/2016/). A progresszió és az EORTC kockázati besorolás között nem volt megfigyelhető szignifikáns korreláció. A Harrell-féle c-statisztika alapján számítva a *HER2* génamplifikációval, a 17-es kromoszóma poliszómiával, a 17-es kromoszóma erős poliszómiával vagy erős poliszómiás tumorsejt populációval rendelkező esetek azonosításával való kombináció javította mind az EAU WHO 1973,

mind az EAU WHO 2004/2016, valamint az AUA kockázati besorolás általános progressziót előrejelző képességét (14. táblázat). A 17-es poliszómiás és/vagy *HER2* amplifikált státusz jelentős differenciáló képessége volt megfigyelhető a progrediáló és nem progrediáló esetek között az EAU magas és nagyon magas kockázati csoportokban (9. ábra).

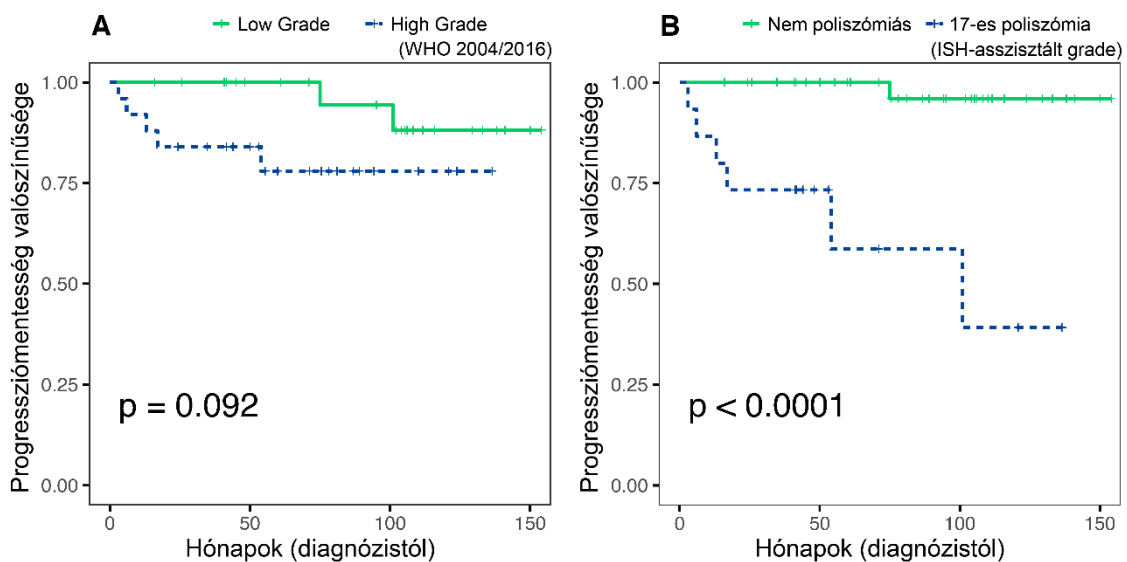


9. ábra. A *HER2* amplifikáció és a 17-es poliszómia hatásának vizsgálata a progresszióig eltelt időre az EAU 2004/2016 szerint magas- és legmagasabb kockázatú húgyhólyagrákokban. Progresszióként definiáltuk, amennyiben egy beteg tumora inzominvazív (T2 vagy magasabb stádiumú) tumorként recidívált. A Kaplan-Meier görbék közti különbséget log-rank teszttel számítottuk ki. Rövidítés: EAU= Európai Urológus Társaság (Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G et al., *Cancers (Basel)*, 2022)¹⁵⁰

IV./2.4. A G2 tumorok molekuláris vizsgálattal történő újbóli osztályozásának hatása az EAU szerinti rizikóbecslésre

Mivel az EAU szerinti kockázati besorolást a WHO 2004/2016 szövettani grade osztályozási rendszere jelentősen befolyásolja, a következőkben a WHO 1973 G2 alcsoportjának átminősítésére összpontosítottunk, mivel ezek low grade vagy high grade

WHO 2004/2016 csoportba sorolása egyes esetekben még gyakorlott uropatológusoknak is kihívást jelenthet. A G2 szövettani grádussal rendelkező NMIBC alcsoportban vizsgálva a TTP nem különbözött szignifikánsan a HG és LG tumorok között ($p=0,092$, 10. ábra), azonban szignifikánsan rövidebb volt a 17-es poliszómás tumorral rendelkező betegekénél ($p<0,001$, 10. ábra). Ennek megfelelően az NMIBC-k WHO 1973 grade szerinti besorolásának WHO 2004/2016 grade-re történő átsorolását a poliszómiás státuszuk alapján javasoljuk: A poliszómás G2 tumorokat HG tumorrá, a nem poliszómás G2 tumorokat pedig LG tumorrá minősítettük át (a G1 és G3 tumorok továbbra is LG, illetve HG tumorok maradtak). Az átsorolást követően a HG NMIBC-k szignifikánsan rövidebb TTP-t mutattak, mint a LG tumorok ($p<0,001$, 11. ábra).

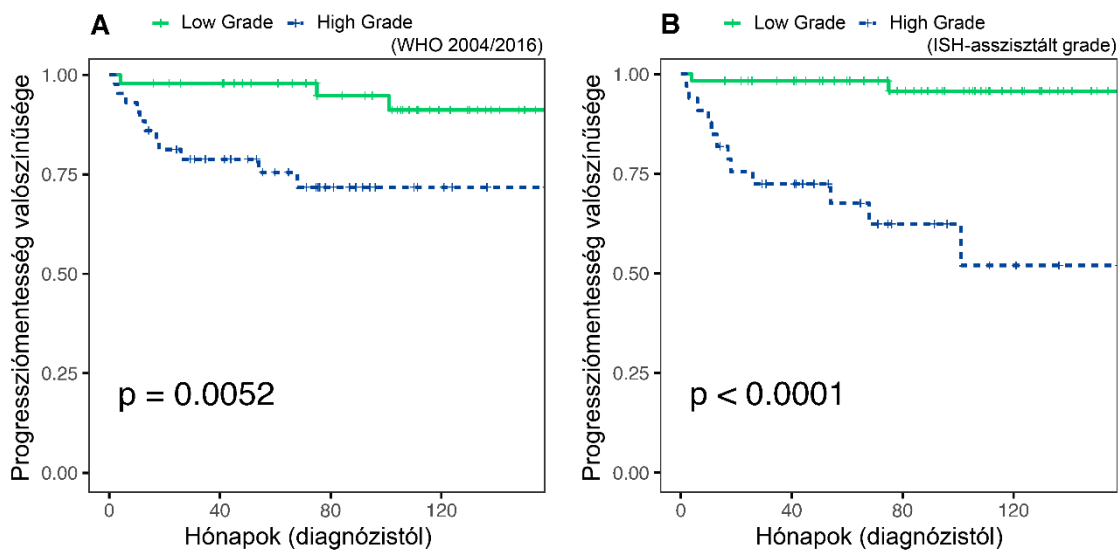


10. ábra. A progresszióig eltelt idő vizsgálata grade 2 (G2) nem izominvazív húgyhólyagrákokban. Progresszióként definiáltuk, amennyiben egy beteg tumora izominvazív (T2 vagy magasabb stádiumú) tumorként recidivált. A Kaplan-Meier görbék közti különbséget log-rank teszttel számítottuk ki. ISH= *in situ* hibridizáció

A: TTP a WHO 2004/2016 szövettani grade (low grade / high grade) szerint a G2 tumorok között.

B: TTP a molekuláris státusz (17-es kromoszóma poliszómia) alapján WHO 2004/2016 low grade / high grade kategóriákba átsorolt G2 tumorok között.

Rövidítések: TTP= progresszióig eltelt idő, WHO= Egészségügyi Világszervezet (Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G et al., *Cancers (Basel)*, 2022)¹⁵⁰



11. ábra. A progresszióig eltelt idő vizsgálata nem izominvazív húgyhólyagrákokban. Progresszióként definiáltuk, amennyiben egy beteg tumora izominvazív (T2 vagy magasabb stádiumú) tumorként recidívált. A Kaplan-Meier görbék közti különbséget log-rank teszttel számítottuk ki.

A: TTP a WHO 2004/2016 (low grade / high grade) szövettani grade szerint.

B: TTP a molekuláris módszerrel támogatott WHO 2004/2016 szövettani grade szerint: a WHO 1973 szerinti G1 tumorok low grade, a G3 tumorok high grade besorolást kapnak, míg a G2 tumorok amennyiben 17-es poliszómiásak high grade, ellenkező esetben low grade minősítésűek.

Rövidítések: ISH= *in situ* hibridizáció, TTP= progresszióig eltelt idő (time-to-progression), WHO= Egészségügyi Világszervezet

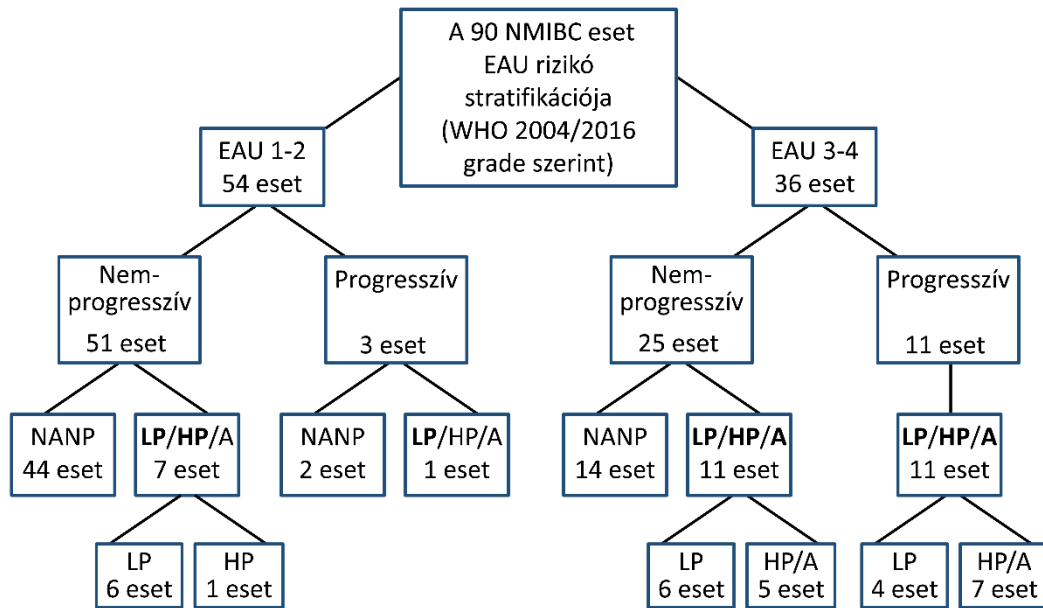
(Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G et al., *Cancers (Basel)*, 2022)¹⁵⁰

Az EAU 2004/2016 kockázati besorolást újraszámítottuk az NMIBC-k módosított szövettani grade osztályozása alapján, ami szignifikánsan rövidebb TTP-t ($p < 0,001$) és magasabb progresszióra vonatkozó relatív hazardot (HR=12,070 (3,324-43,810), $p < 0,001$) eredményezett a magas/nagyon magas EAU-kockázati csoportba tartozó tumorok esetében. Továbbá az új, poliszómia státusz alapján átminősített EAU 2004/2016 kockázati besorolás magasabb c-indexet mutatott, mint az eredeti besorolás, ami jobb

modellre utal (a módosított EAU 2004/2016 c-indexe = 0,796 vs. az eredeti EAU 2004/2016 c-indexe = 0,741).

IV./2.5. A 17-es poliszómia/ *HER2* amplifikáció lehetséges alkalmazásai a diagnosztikai gyakorlatban nem izominvazív hólyagrákok rizikóstratifikációjának javítása érdekében

Megvizsgáltuk, hogy a Chr17 poliszómia és a *HER2* amplifikációs státusz felhasználható-e a gyakorlatban a progresszív esetek szűrésére és pontosabb rizikóstratifikáció elérésére az EAU 2004/2016 kockázati csoportokba tartozó esetek átminősítésével. Az EAU besorolás szerint progresszióra vonatkozóan magas és nagyon magas kockázattal rendelkező esetek között a nem *HER2*-amplifikált, nem poliszómás esetek egyike sem mutatott progressziót a követés során, míg a poliszómás és/vagy *HER2*-amplifikált tumorok esetében a progresszió aránya 50% volt (12. ábra). Ezzel szemben az alacsony és közepes kockázatú NMIBC-k között a három progresszív eset közül csak egy volt 17-es kromoszóma poliszómás és/vagy *HER2*-amplifikált. Mivel a *HER2*/ 17-es kromoszóma FISH jelentős hozzáadott értéke volt megfigyelhető az EAU magas és nagyon magas kockázati csoportokban, így elsősorban ezekben a csoportokban javasolt ezen molekuláris vizsgálatok elvégzése, ezáltal a nem *HER2*-amplifikált és nem poliszómás esetek átsorolása az EAU 2 (közepes) kockázati csoportba. Ezen megközelítés által az EAU magas és nagyon magas kockázati csoportokba tartozó esetek közel 40%-a (a vizsgált kohorszban 14 eset) progresszióra vonatkozóan alacsonyabb kockázatúként lenne azonosítható, így esetükben megelőzhető lenne a szükségtelenül szigorú követés és kezelés. Továbbá az előbbieken felvázolt átsorolást alkalmazva a progrediáló esetek magas, illetve nagyon magas kockázatúként való azonosításának általános pontossági aránya 30%-ról [11/36] 50%-ra [11/22] javul.

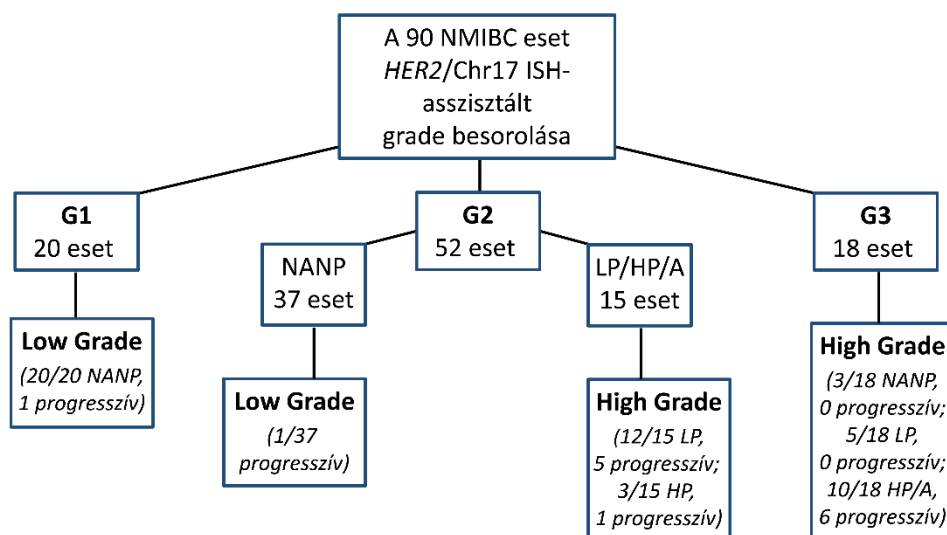


12. ábra. A 17-es poliszómia / *HER2* amplifikációs státusz lehetséges alkalmazása a diagnosztikai gyakorlatban nem izominvazív hólyagrákok EAU szerinti rizikó stratifikációjának javítása érdekében. A félkövér betűtípus jelzi mely molekuláris elváltozások vannak jelen az adott alcsoportban. A magas és nagyon magas kockázatú esetek (EAU 3-4-es rizikócsoporthoz) között a nem *HER2*-amplifikált, nem poliszómás esetek egyike sem progressziót mutat, míg a poliszómás és/vagy *HER2*-amplifikált tumorok esetében a progresszió aránya 50% volt. Ezért azt javasoljuk, hogy a nem *HER2*-amplifikált, nem poliszómás EAU 3-4-es eseteket soroljuk át az EAU 2-es (közepes) kockázati csoportba, hogy megelőzzük e betegek szükségtelenül szigorú követését és felesleges kezelését. Ezáltal a progresszív esetek magas / nagyon magas kockázatú NMIBC-ként való azonosításának általános pontossági aránya 30%-ról [11/36] 50%-ra [11/22] javul.

EAU= European Association of Urology, NMIBC= nem izominvazív hólyagrák, NANP= nem *HER2*-amplifikált és nem 17-es poliszómiás, LP= 17-es poliszómia, HP= erős 17-es poliszómia, A= *HER2*-amplifikáció, WHO: Egészségügyi Világszervezet (Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G et al., *Cancers (Basel)*, 2022)¹⁵⁰

Egy másik lehetséges stratégia a WHO 1973-as grade G1, G2, G3 kategóriáinak finomítása a 17-es poliszómia és a *HER2* amplifikációs státusz felhasználásával. A 20 G1-es daganat közül csak egy progressziót mutat, és sem ebben az esetben, sem a többiben nem volt jelen a 17-es poliszómia és/vagy *HER2*-amplifikáció (13. ábra). A G2 hólyagrákok

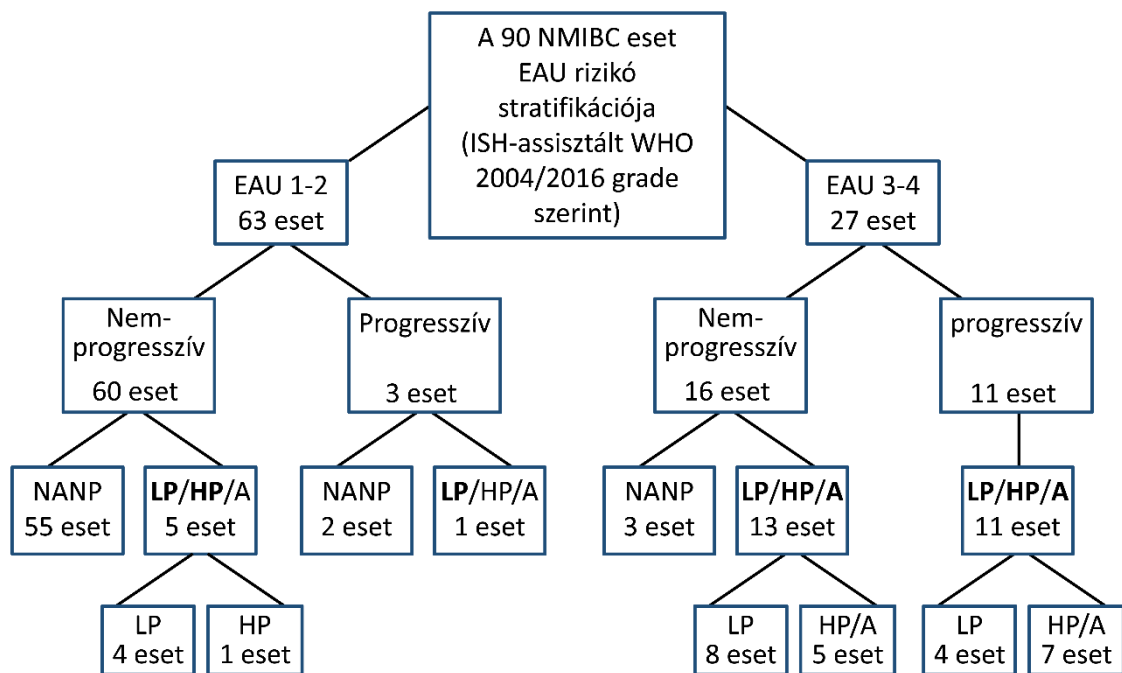
között csak alacsony 17-es poliszómia (Chr17/sejt $\geq 2,25$ és $< 3,45$) volt megfigyelhető, amely 6/7 progrediáló és 7/45 nem progrediáló esetben volt jelen. A 18 G3-as daganat közül hat progrediált, és ezen esetek mindegyikében magas 17-es poliszómia (Chr17/sejt $> 3,45$) és/vagy *HER2*-amplifikáció volt megfigyelhető. A fentiek alapján azt javasoljuk, hogy a G1 tumorokat továbbra is alacsony kockázatúnak (low grade / LG), a G3 tumorokat pedig magas kockázatúnak (high grade / HG) kell tekinteni a progresszió szempontjából. A molekuláris rendellenesség nélküli G2 tumorok alacsony progressziós kockázatúnak (LG) tekinthetőek, míg a 17-es poliszómiával vagy *HER2* amplifikációval rendelkező tumorok magas progressziós kockázatúnak (HG). Így a 27 G2-LG esetből 4 kerül HG-be átsorolásra, ebből 1 progrediált. A 25 G2-HG esetből 14 kerül LG-be visszatorolásra, ezek közül egy sem (0) progrediált.



13. ábra. A 17-es poliszómia / *HER2* amplifikációs státusz lehetséges alkalmazása a diagnosztikai gyakorlatban a nem izominvazív hólyagrakok fokozati (grade) beosztásának javítása érdekében, a G2 daganatok átsorolásával a low grade / high grade beosztásba. A G1 NMIBC-eket továbbra is alacsony kockázatú (low grade / LG), a G3 tumorokat pedig magas progressziós kockázatú (high grade / HG) daganatként javasoljuk besorolni. A G2 tumorok közül a nem *HER2*-amplifikált, nem poliszómás eseteket alacsony progressziós kockázatúnak (low grade - LG) javasoljuk tekinteni, míg a 17-es poliszómiát vagy *HER2*-amplifikációt mutató tumorokat magas progressziós kockázatúnak (high grade - HG).

NMIBC= nem izominvazív hólyagrák, NANP= nem *HER2*-amplifikált és nem 17-es poliszómiás, LP= 17-es poliszómia, HP= erős 17-es poliszómia, A= *HER2*-amplifikáció, WHO= Egészségügyi Világszervezet, ISH= *in situ* hibridizáció (Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G et al., *Cancers (Basel)*, 2022)¹⁵⁰

Ha a WHO 2004/2016 szöveti grade osztályozással végzett EAU rizikóbesorolást ezzel a molekuláris módszerrel támogatott LG/HG osztályozási módszerrel végezzük, a progrediáló NMIBC esetek EAU magas vagy nagyon magas kockázati csoportokba sorolásának pontossága jelentősen javul (30%-ról [11/36] 40%-ra [11/27]. Továbbá, amennyiben a további három nem *HER2*-amplifikált, nem poliszómás esetet is átsoroljuk a közepes kockázatú kategóriába, a teljes pontossági arány eléri a 46%-ot [11/24] (14. ábra).



14. ábra. A 17-es poliszómia / *HER2* amplifikációs státusz lehetséges alkalmazása a diagnosztikai gyakorlatban nem izominvazív hólyagrákok EAU szerinti rizikóstratifikációjának javítása érdekében, a WHO 2004/2016 szöveti grade osztályozást *in situ* hibridizációval támogatott LG/HG osztályozási megközelítéssel végezve.

Progresszió az EAU 2004/2016 rizikócsoportokban ISH-asszisztált szövettani grade szerint. A vastag betűk jelzik, hogy az adott alcsoportban melyik molekuláris elváltozás

van jelen. Amennyiben az EAU WHO 2004/2016-os kockázati rétegzést az ISH-támogatott LG/HG osztályozással végezzük (lásd a 12. ábrán), a progresszív NMIBC esetek EAU magas/nagyon magas kockázatú csoportba sorolásának pontossága jelentősen javul (30%-ról [11/36] 40%-ra [11/27], de ha a további három nem-*HER2* amplifikált, nem poliszómás esetet is átsoroljuk a közepes kockázatú kategóriába, a teljes pontossági arány eléri a 46%-ot [11/24].

EAU= European Association of Urology, NMIBC= nem izominvazív hólyagrák, NANP= nem *HER2*-amplifikált és nem 17-es poliszómiás, LP= 17-es poliszómia, HP= erős 17-es poliszómia, A= *HER2*-amplifikáció, WHO= Egészségügyi Világszervezet, ISH= *in situ* hibridizáció

(Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G et al., *Cancers (Basel)*, 2022)¹⁵⁰

IV./2.6. A p53 fehérjeexpresszió összefüggése a 17-es kromoszóma poliszómia és *HER2* amplifikáció státusszal és a nem izominvazív hólyagrákok progressziójával

A 90 esetből 85 esetben állt rendelkezésre p53 immunhisztokémiai eredmény, mivel 5 esetben a tumor festése technikai okok miatt nem volt lehetséges (pl. a tumorszövet a többszöri metszés során kifaragódott stb.). *TP53* mutációval összefüggő p53 fehérjeexpressziós mintázat a 12 kontroll eset egyikében sem volt megfigyelhető. Az NMIBC tumorok *TP53* mutációs státusza nem mutatott szignifikáns összefüggést a progresszióval (egyváltozós Cox-analízis, 12. táblázat). Ugyanakkor statisztikailag szignifikáns összefüggést találtunk az NMIBC tumorok p53 expressziója és a 17-es poliszómia között (15. táblázat).

15. táblázat. A daganatok p53 immunhisztokémiai eredményeinek és 17-es kromoszóma státuszának kapcsolata.

Egy eset p53-státuszát akkor tekintettük negatívnak, ha a magi pozitivitás aránya a tumorsejtek teljes számának 1-49%-a között volt (ami vad típusú p53-nak felel meg), míg a 0% és 50-100%-os festődési arányt pozitív p53-státusznak tekintettük (abnormális p53 IHC-mintázat). CI (OR)= az esélyhányados megbízhatósági tartománya [Confidence interval (odds ratio)] – a tartomány alsó és felső határértékének megadásával.

Chr 17 státusz	p53 IHC pozitív	p53 IHC negatív	p CI (OR)	
	n (%)	n (%)	alsó	felső
17-es poliszómia				
Poliszómiás (≥ 2.25 Chr 17 jel/sejt)	15 (71,43)	10 (15,63)	<0,001	3,708 51,618
Nem poliszómiás (<2.25 Chr 17 jel/sejt)	6 (28,57)	54 (84,38)		
Erős 17-es poliszómia				
Erős poliszómiás (≥ 3.45 Chr 17 jel/sejt)	6 (28,57)	2 (3,13)	0,002	1,895 132,114
Nem erős poliszómiás (<3.45 Chr 17 jel/sejt)	15 (71,43)	62 (96,88)		
Erős poliszómiás sejtpopuláció				
Igen	15 (71,43)	17 (26,56)	<0,001	2,065 24,869
Nem	6 (28,57)	47 (73,44)		

Megvizsgáltuk a p53 expresszió lehetséges alkalmazását a progrediáló és nem progrediáló esetek megkülönböztetésére az EAU magas kockázati csoportjában. Az EAU magas kockázati csoportjában a nem progrediáló esetek közül 8 p53-pozitív és 16 p53-negatív esetet azonosítottunk, míg a progrediáló esetek közül 5 eset volt p53-pozitív, és 5 eset volt p53-negatív (16. táblázat).

16. táblázat. A p53 immunhisztokémiai eredmények összefüggése az egyéb változókkal.

<i>p53 expresszió vs. egyéb változók</i>	nem-progresszív NMIBC			Rész-összeg	progresszív NMIBC			Rész-összeg	Összesen
	<1%	1-49%	50-100%		<1%	1-49%	50-100%		
p53 pozitivitás a sejtmagok %-ában									
pTa	3	31	4	38	-	3	-	3	41
pT1	3	25	6	34	1	5	3	9	43
pTis	-	-	-	0	-	-	1	1	1
G1	-	18	1	19	-	1	-	1	20
G2	3	33	6	42	1	5	1	7	49
G3	3	5	3	11	-	2	3	5	16

Low Grade	2	38	1	41	-	3	-	3	44
High Grade	4	18	9	31	1	5	4	10	41
EAU 2004/2016 alacsony rizikó (1-2)	3	40	5	48	-	3	-	3	51
EAU 2004/2016 magas rizikó (3-4)	3	16	5	24	1	5	4	10	34
17-es poliszómia	3	6	7	16	1	4	4	9	25
Erős 17-es poliszómia	1	1	2	4	1	1	3	5	9
Erős poliszómiás sejtpopuláció	2	12	8	22	1	5	4	10	32
<i>HER2</i> amplifikáció	1	1	2	4	-	2	1	3	7
17-es poliszómia és/vagy <i>HER2</i> amplifikáció	3	6	7	16	1	4	4	9	25
Nem amplifikált, nem poliszómiás	3	50	3	56	-	4	-	4	60
<i>HER2</i> IHC 0-1+	4	34	2	40	1	4	-	5	45
<i>HER2</i> IHC 2+	1	20	5	26	-	3	3	6	32
<i>HER2</i> IHC 3+	1	2	3	6	-	1	1	2	8

Bár az EAU magas kockázati csoportból csak a 17-es poliszómiás/ *HER2*-amplifikált esetek progrediáltak izominvazív tumorrá (11 eset), azonban a 25 nem progrediáló esetből további 11 esetben is kimutatható volt a 17-es poliszómia és/vagy *HER2*-amplifikáció. Ennek megfelelően megvizsgáltuk, hogy ezekből a 17-es poliszómiás és/vagy *HER2* amplifikált NMIBC esetekből a p53-státusz alkalmazható-e további nem progrediáló esetek kisselektálására az EAU magas kockázati csoportjából. Nem találtuk azonban a p53-pozitivitás olyan határértékét, amely önmagában vagy a 17-es poliszómia / *HER2* amplifikációs státusszal kombinációban megfelelően megkülönböztetné a nem progrediáló és progrediáló eseteket az EAU magas kockázati csoportjában.

V. MEGBESZÉLÉS

A nem izominvazív hólyagrákban szenvedő betegek optimális kezelési és követési stratégiáinak meghatározására az EAU és az AUA klinikopatológiai faktorokon alapuló rizikóbecslő táblái nyújtanak segítséget. Az EAU progresszió valószínűségét meghatározó besorolása az EORTC progressziós pontszám rendszerén alapul, és nemrégiben új klinikai kockázati tényezőkkel frissítették, beépítve az 1973-as és a 2004/2016-os WHO szövettani grade osztályozási rendszert is.^{45,61} Ezek a kockázatbecslő rendszerek azonban messze nem tökéletesek, például az EAU magas és nagyon magas kockázati csoportjában a 10 éven belül izominvazív tumorrá progrediáló tumorok aránya mindössze 14%, illetve 53%.⁴⁵ Egyes tanulmányok szerint ez az arány még ennél is alacsonyabb lehet.¹⁵² A széles körben használt konvencionális prognosztikai faktorokon alapuló rizikóbecslő táblák ezen pontatlanságából fakadóan egyes betegek esetében a szükségesnél többször kerülnek elvégzésre betegkövetési vizsgálatok, de e túlvizsgáláson felül a daganat valós agresszivitásához képest akár a túlkezelésük is előfordulhat. Ez rendkívül nagy terhet ró mind a betegre, mind az egészségügyi rendszerre, ebből kifolyólag nagy szükség van a nem izominvazív hólyagrák progressziós kockázatának pontosabb értékelésére. A jelenleg konvencionális prognosztikai faktorokon alapuló rizikóbecslő rendszerek molekuláris markerekkel való pontosítására ez idáig számos kísérlet történt, és a témában megjelent tanulmányok eredményei ígéretesek, azonban ez idáig még egyiket sem találták alkalmasnak a rutin klinikai gyakorlatba és diagnosztikába való bevezetésre.^{12,45}

A húghólyagrák progresszióját fokozott kromoszóma-instabilitás és aneuploidia kíséri.^{127,131} Citogenetikai vizsgálatok számos kromoszóma, így például a 3-as, 7-es, 8-as és 17-es kromoszómák számbeli eltéréseinek gyakori előfordulását találták hólyagrákban, továbbá kimutatták, hogy az uroteliális daganatsejtek nagyfokú (erős) kromoszómális poliszómiája együtt jár a nem izominvazív hólyagtumorok izominvazív betegséggé történő progressziójával.^{127,131,132} Vizsgálataink során az volt a hipotézisünk, hogy az izominvazív tumorokra jellemző citogenetikai elváltozások egy része már a nem izominvazív stádiumban is jelen van, ami lehetővé teszi a későbbiekben progrediáló esetek előrejelzését. Bizonyos kromoszómák számbeli eltéréseinek vizsgálatára alkalmas a UroVysion teszt, amit a vizeletben lévő daganatsejtek citogenetikai eltéréseinek

elemzésére fejlesztettek ki, így első vizsgálatunkban ezen teszt prognosztikai értékét elemeztük.

Az utóbbi évtizedben gyakran felvetették egy alternatív, objektívebb UroVysion értékelési protokoll szükségességét az uroteliális karcinómák diagnózisára, mivel a UroVysion teszt értékelésére és pozitivitási kritériumaira vonatkozó gyártói ajánlások ellentmondásosak.^{153–159} Mivel a gyártó eredetileg csak a fenotípusosan azonosított tumorsejtek jelmintázatának vizsgálatát tette a kiértékelési protokoll részévé, munkacsoportunk egy korábbi tanulmányban azt javasolta, hogy minden más, genetikai eltérést mutató sejtet is értékeljünk és pozitív sejtként vegyünk figyelembe, ha megfelel a UroVysion teszt kritériumainak.¹⁵³ Ezt később a gyártó elfogadta, és a teszt felhasználási útmutatójába beemelte. Ugyancsak hozzájárulhat a teszt pontosabb kiértékeléséhez az uroteliális eredetű sejtek cytokeratin-7 immunhisztokémiával történő fenotipizálása, a cytokeratin-7 pozitív sejtek automatizált azonosítása, és előszelekciója a UroVysion FISH kiértékelés számára, továbbá a helyileg meghatározott, de standardizált határértékek alkalmazása is tovább növelheti a diagnosztikai pontosságot.¹⁵⁴ Ezen felül az előbb említett és további más tanulmányok a citogenetikailag abnormális sejtek százalékos arányának meghatározásának hasznosságát hangsúlyozták a kiértékelt mintában prognosztikai célokra is.¹⁵⁵ Kipp és munkatársai azt találták, hogy a genetikailag abnormális sejtek megnövekedett aránya összefüggésbe hozható a hólyagrák kiújulásával és az izominvazív tumorrá történő progresszióval.¹⁵⁵ A sejtek genetikai aberrációi (kromoszóma-instabilitás) azonban szintén befolyásolhatják a daganatok biológiai viselkedését. Ennek megfelelően Matsuyama és munkatársai 2014-ben kimutatták, hogy a UroVysion által detektált kromoszómák kópiaszám-változásainak nagyobb gyakorisága korrelált a nagyobb malignus potenciállal és a betegség progressziójával.¹⁶⁰ Mindezek alapján munkánk során egy új, UroVysion-teszten alapuló prognosztikai osztályozást fejlesztettünk ki az izominvazív történő progresszió kockázatának meghatározására nem izominvazív húgyhólyagrakokban. A korábbi tanulmányokkal összhangban azt találtuk, hogy mind a citogenetikailag abnormális sejtek százalékos aránya, mind a citogenetikai abnormalitás szintje (UroVysion FISH rizikóskála) szignifikánsan korrelált a prognózissal. Azonban míg a citogenetikailag abnormális sejtek százalékos aránya csak a progresszióig eltelt idővel korrelált, a citogenetikai abnormalitás szintje a progresszió-mentes túléléssel is, és összességében

hatékonyabban határozta meg a progresszió kockázatát. Meglepő módon, amikor ezt a két változót különféle matematikai módszerekkel egy indexbe próbáltuk kombinálni, a prognosztikai képesség csökkent. Ennek lehetséges oka, hogy a citogenetikailag abnormális sejtek százalékos arányát a vizeletben nemcsak a daganat prognosztikailag releváns biológiai jellemzői befolyásolhatják, hanem számos más tényező is (pl. a normális és a tumorsejtek lebomlási rátája közötti különbségek a vizeletben, a tumor lokalizációja, a tumorfelszín kiterjedése/kifekélyesedése, technikai kérdések, mint pl. a vizeletgyűjtés módszerének standardizálása, a tumorsejtek izolálásának hatékonysága stb.). Tovább vizsgálva az általunk létrehozott citogenetikai rendellenességen alapuló UroVysion FISH rizikóskálát, a citogenetikai abnormalitás szintje nemcsak pozitív korrelációt mutatott az uroteliális karcinómák stádiumával és szövettani fokozatával a teljes vizsgált betegcsoportban, hanem a nem izominvazív húgyhólyagrákok független prognosztikai faktorának is bizonyult a progresszió-mentes túlélés és a progresszióig eltelt idő tekintetében, mind a reszekált tumor hisztológiai vizsgálata során nyert változókkal (tumor stádium, szövettani grade) együtt, mind azok nélkül elemezve. Következésképpen a citogenetikai abnormalitás szintje prognosztikai információt nyújthat a tumor méretének, szövettani grádusának, stádiumának ismerete nélkül is, de a TURBT során nyert reszekátum vizsgálata során értékelt hagyományos prognosztikai faktorokhoz hozzáadva is javíthatja a prognosztikai pontosságot. Ezen túlmenően a G1 szövettani fokozatú tumorok esetében szoros összefüggést találtunk a tumor kiújulásával, de a G2 vagy G3 daganatok esetében nem. Mivel az alacsony citogenetikai abnormalitási szint a TaT1 stádiumban alacsony progressziós rátát jelez előre, ezért a progressziómentes kiújulás nagy valószínűséggel fordul elő a UroVysion FISH rizikóskála alacsony kockázatú csoportjába tartozó G1 szövettani grádusú nem izominvazív húgyhólyagrákokban. Érdekes módon a 9p21 deléció más irodalmi adatok szerint összefüggésbe hozható a daganat kiújulásával, azonban saját kohorszunk ezen fokozott kiújulási tendenciát mutató eseteiben a biállélikus 9p21 deléció előfordulása nem volt megemelkedett, ami a hólyagrák kiújulásának más, még ismeretlen mechanizmusának lehetőségét veti fel.^{160,161}

Az uroonkológia egyik legfontosabb kérdése a nem izominvazív húgyhólyagrákok izominvazív betegséggé történő progressziójának előrejelzése.^{45,162,163} Egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy az erős poliszómiás T1 stádiumú

húgyhólyagrákok nagyobb valószínűséggel fejlődnek izominvazív tumorrá.¹³² Továbbá Lodde és munkatársai egy UroVysion-teszten alapuló prognosztikai modellt javasoltak az intermedier EAU rizikócsoportha tartozó húgyhólyagrákok molekuláris grade alapján történő alacsony és magas rizikócsoportha történő sorolására.¹⁶⁴ Modelljük különbséget tesz alacsony kockázatú (p16-deléció, 3-as kromoszóma aneuszómia) és magas kockázatú (7-es és 17-es kromoszóma aneuszómia) kromoszóma-aberrációk között. Vizsgálatunk során magunk azonban nagyobb prognosztikai erejűnek találtuk a 3, 7, 17 kromoszómák abszolút kópiaszám-változásának és a 9-es kromoszóma kópiaszám-gyarapodásának kvantitatív meghatározását (ez utóbbi esetében a UroVysion tesztben a 9p21 lókuszt /p16/ specifikus próba szerepel, melynek biallélikus deléciója a teszt egyik pozitivitási kritériuma, így a jel mono- vagy biallélikus hiányát nem tekintettük aneuploidia jelének, azonban felszaporodása minden esetünkben társult valamely más kromoszóma többszöröződéséhez is, így ezt a 9-es kromoszóma poliszómiájának tulajdonítottuk). Lodde és munkatársai úgy találták, hogy a molekuláris grade független előrejelzője a progresszióknak, a magas molekuláris grádusú tumorok 2,53-szoros eséllyel progrediálnak az alacsony molekuláris grádusú tumorokkal szemben.¹⁶⁴ Ezzel az eredménnyel összhangban saját tanulmányunkban a citogenetikai abnormalitás szintjét a progressziómentes túlélés és a progresszióig eltelt idő független prognosztikai tényezőjének találtuk a nem izominvazív tumorok esetében, továbbá úgy tűnik, hogy saját modellünk mind a hazard ratio, mind a C-index eredményei tekintetében felülmúlja a Lodde és munkatársai által javasolt molekuláris osztályozást. Nevezetesen, a magas UroVysion FISH rizikóskála pontszámmal rendelkező nem izominvazív húgyhólyagrákok lényegesen nagyobb valószínűséggel progrediáltak izominvazív betegségbe, ami szignifikánsan rövidebb progressziómentes túlélést és progresszióig eltelt időt, valamint jelentősen megnövekedett hazard ratiót eredményezett (PFS: 4,09/6,89 és TTP: 22,08/34,05 a Cox / Kaplan-Meier módszerrel). Továbbá az általunk vizsgált nem izominvazív húgyhólyagrákos betegcsoportban a UroVysion FISH rizikóskála a nemzetközi irányelvek által ajánlott rizikóbecslő tábláknál (EAU, AUA, EORTC) jobban elkülönítette a progresszió szempontjából alacsony és magas kockázattal rendelkező betegeket. A UroVysion FISH rizikóskála kombinációja az EORTC és az AUA rizikóbecslő tábláival jelentősen javította a C-indexet mind a PFS, mind a TTP tekintetében, ami az általunk kifejlesztett kockázatértékelési rendszer további

prognosztikai értékét jelzi. Az általunk vizsgált betegcsoportban a legjobb klinikopatológiai faktorokon alapuló kockázatbecslő rendszernek az AUA által javasolt rizikóbecslő tábla bizonyult, a C-index a progressziómentes túlélés esetében 0,71, míg a progresszióig eltelt idő esetében 0,79 volt. A UroVysion FISH rizikóskála hozzáadása a modellhez a C-indexet előbbi esetben 0,76-ra, míg utóbbi esetben 0,90-re növelte, ami jó/erős prediktív értéknek felel meg. Petrov és munkatársai szignifikáns különbséget találtak a citogenetikai eltérések arányában 39 nem izominvazív és 11 izominvazív tumor között preoperatív UroVysion teszt segítségével.¹³⁴ A mi eredményeink ezt határozottan alátámasztják, a UroVysion FISH rizikóskála segíthet az izominvazív tumorban szenvedő betegek azonosításában akár a transzuretrális reszekciót megelőzően. Ez az információ hasznos lehet az optimális kezelési stratégiák meghatározásában és azon esetek azonosításában, amelyekben szükségessé válhat az ismételt TURBT.

A nem izominvazív húgyhólyagrakok izominvazívvá történő progressziójának fluoreszcens *in situ* hibridizációval vizeletmintán történő előrejelzését vizsgáló tanulmányunk egyik legfőbb limitációja a retrospektív vizsgálati módszer. További limitáló tényező, hogy az 50 nem progresszív nem izominvazív tumorból 22 tumor szerepelt a validációs adathalmazban, mivel nem állt rendelkezésre további olyan független betegcsoport, amelybe megfelelő számú, a műtétet megelőzően levett vizeletmintán végzett UroVysion-teszttel rendelkező beteg lett volna bevonva megfelelő mennyiségű klinikai és követési adattal. A progresszív (későbbiekben izominvazívvá váló) Ta/T1 (nem izominvazív) tumorok azonban csak a teszt adathalmazban szerepeltek, biztosítva a progresszió (izominvazió) előrejelzésének függetlenségét. Limitáció volt továbbá a viszonylag kis kohorszméret (75 beteg, ebből 57 nem izominvazív tumor), így a progrediáló esetek abszolút száma a hosszú követés ellenére viszonylag alacsony maradt. A vizsgált betegcsoport tumorainak többsége kis (<3 cm), szoliter primer tumorokból állt, és körülbelül felük Ta stádiumban volt, ezáltal az EORTC rizikótábla alacsony kockázatúként azonosította ezen betegeket, így vizsgálatunkban az EORTC-rendszer nem volt képes jelentős különbségeket azonosítani a különböző EORTC rizikócsoportba tartozó betegek kimenetele között. Természetesen ez a korlátozott kohorszmérettel is összefügghet. E korlátok ellenére azonban eredményeink határozottan arra utalnak, hogy a UroVysion FISH rizikóskála hasznos lehet a nem izominvazív húgyhólyagrakok agresszív viselkedésének előrejelzésében. Ugyanakkor további

vizsgálatokra van szükség a skála klinikai gyakorlatban betöltött szerepének tisztázásához és a betegség progressziójának szempontjából eltérő kockázattal rendelkező további alcsoportok azonosításához.

Mivel előző vizsgálatunk során azt találtuk, hogy a vizeletcitológiai mintákból UroVysion FISH-teszttel kimutatott kromoszóma kópiaszám-változások, köztük a 17-es kromoszóma poliszómia, az izominvázio független prognosztikai faktorai, ezért második vizsgálatunkban célunk volt a patológiai diagnosztikában rutinszerűen alkalmazott *HER2/Chr17* kettős *in situ* hibridizációs módszerrel tovább vizsgálni a 17-es kromoszóma kópiaszám-változások prognosztikai értékét nem izominvazív húgyhólyagrak szövetmintákon. Továbbá, mivel a *HER2* génhez hasonlóan a p53 fehérje is a 17-es kromoszómán kódolódik, és mindkettő prognosztikai potenciált hordoz a húgyhólyagrakban, valamint mindkettőt gyakran vizsgálják immunhisztokémiai módszerrel a rutin diagnosztikában, így arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy a 17-es kromoszóma kópiaszám-változásai és az aktualizált EAU-rizikótábla mellett ezen markerek nyújthatnak-e további prognosztikai értéket.^{139,144} A 17-es kromoszóma poliszómia és *HER2* státusz nem izominvazív hólyagrakok progressziójára gyakorolt hatását vizsgáló tanulmányunkban bemutatjuk, hogy ezen molekuláris markerek hozzáadása az EAU által javasolt rizikóbecslő rendszerhez javíthatja annak pontosságát. Továbbá különösen jól alkalmas ez a megközelítés a grade 2 tumorok low grade és high grade kategóriákba történő átsorolására. Amennyiben ezt a *HER2/Chr17 in situ* hibridizációval támogatott WHO 2004/2016 besorolást használjuk az EAU által javasolt rizikócsoporthoz meghatározásához, lényegesen jobb találati arány érhető el a későbbiekben progrediáló nem izominvazív tumorok esetében az EAU WHO 2004/2016 magas/nagyon magas kockázati kategóriáiban, így a betegek e molekuláris markerekkel támogatott alosztályozása segíthet a betegség kezelésének és követési stratégiájának optimalizálásában.

Amint arról más munkacsoportok is beszámoltak, a 17-es poliszómiához magasabb szövettani grade és izominvazív stádium társul hólyagrakban, továbbá az aneuszómiás sejtpopulációk száma jelentősen magasabb a pT1, mint a pTa stádiumú tumorokban.^{129,140,165} Ezzel összhangban mi is azt találtuk, hogy a 17-es poliszómia magasabb grádust és stádiumot von maga után a nem izominvazív tumorokban, továbbá

a 17-es kromoszóma kópiaszám-változások független prognosztikai faktorok a jól ismert klinikai és szövettani kockázati tényezőkön túl.

Bár korábbi tanulmányok összefüggésről számoltak be a HER2 overexpresszió és a magasabb stádium és szövettani grade között, mi nem találtunk összefüggést a nem izominvazív tumorok progressziója és a HER2 overexpresszió között.^{136–138} Ez egyrészt a HER2 IHC eredmények eltérő értelmezéséből adódhat (mi csak az IHC 3+ eseteket tekintettük HER2-pozitívnak az ASCO/CAP 2018-as emlődák HER2 irányelvének megfelelően, míg mások a 2+ eseteket is HER2-pozitívnak tekintették, vagy más kritériumokat használtak). Azonban valószínűbb, hogy ezen eltérés a 17-es kromoszóma poliszómás tumorok között megfigyelhető HER2 expressziós szint nagyfokú diszkrepanciájának tulajdonítható.^{136–138,148} Ugyanis saját megfigyeléseink alapján míg a *HER2* amplifikált tumorok konzekvensen 3+ pozitivitást mutatnak, a 17-es poliszómia a negatív (0/1+), az equivocal (2+) és a pozitív (3+) HER2 immunhisztokémiai expressziós fokozatok bármelyikében megnyilvánulhat.

Más munkacsoportok a *HER2*-amplifikációról is leírták, hogy magasabb stádiummal, szövettani grádussal és rossz prognózissal jár együtt nem izominvazív hólyagrákokban.¹³⁹ Mohanty és munkatársai vizsgálatuk során arra a következtetésre jutottak, hogy az ASCO/CAP 2018-as irányelv használata csökkenteti a HER2-pozitivitás arányát a high grade uroteliális karcinómák esetében a 2013-as verzióhoz képest.¹⁶⁶ Adataink azt mutatják, hogy az ASCO/CAP 2018-as irányelv szerint végzett *HER2*/Chr17 ISH alkalmazható az NMIBC-k kockázatbecslésében, mivel további prognosztikai információt nyújt ezen betegek számára. Ennek megfelelően kimutattuk, hogy a 17-es kromoszóma kópiaszám-eltérés (poliszómia, erős poliszómia, erős poliszómiás különálló sejtpopuláció jelenléte a mintában) és a *HER2*-amplifikáció státusz hozzáadása a frissített EAU rizikóbecslő rendszerhez tovább javíthatja azt akár a WHO 1973-as, akár a 2004/2016-os szövettani grade osztályozási rendszer használata mellett. Továbbá tanulmányunkban megerősítettük, hogy függetlenül attól, hogy a WHO 1973 vagy 2004/2016 szövettani grade besorolási rendszert használjuk, a frissített EAU rizikóbecslő rendszer felülmúlja az eredeti változatot, azonban a szövettani grade WHO 2004/2016 szerinti besorolása pontosabb EAU kockázatbecslést eredményez a nem izominvazív tumorok esetében. Ezt tovább javíthatja a javaslatunk szerinti molekuláris (*in situ* hibridizáció-támogatott) alosztályozás, mivel a 17-es kromoszóma poliszómia és

a *HER2*-amplifikáció hiánya alacsony progressziós kockázatot jelent, ezért javasoljuk a nem *HER2*-amplifikált, nem poliszómás esetek átminősítését az EAU 2004/2016 magas és nagyon magas kockázatú csoportjából a közepes kockázatú csoportba.

Mások a p53 fehérje rendellenes nukleáris expresszióját is prognosztikai faktorként azonosították a high grade uroteliális rákokban.¹⁴⁴ Ebből fakadóan reméltük, hogy a p53 expressziós adatok hozzáadásával javíthatjuk a nem izominvazív tumorok EAU rizikótáblán és Chr17 poliszómia/*HER2* amplifikációs státuszon alapuló rizikóbecslésének pontosságát. A rendellenes p53-expresszió azonban vizsgálatunkban nem mutatott szignifikáns összefüggést a nem izominvazív tumorok izominvazívvá történő progressziójával, annak ellenére, hogy a p53-expresszió és a nem izominvazív hólyagrákok 17-es kromoszóma poliszómia státusza között statisztikailag szignifikáns összefüggést találtunk. Továbbá a p53-expressziós státusz nem volt elég hatékony sem a progrediáló és a nem progrediáló esetek megkülönböztetésében az EAU magas kockázatú csoportjában, sem a 17-es poliszómiás / *HER2* amplifikált és a nem poliszómiás / nem amplifikált esetek megkülönböztetésében az EAU magas kockázatú tumorok nem progrediáló alcsoportjában.

Bár a grade 2 tumorok low grade és high grade szerinti differenciálása a patológus számára kihívást jelenthet, a WHO 2004/2016-os szövettani osztályozási rendszer reprodukálhatósága valamivel jobb az elődjénél, ugyanakkor ez az osztályozás nem bizonyult jobbnak a WHO 1973-as osztályozásnál a betegség kiújulásának és progressziójának előrejelzésében.¹⁶⁷ Különösen az izominvazív tumorok esetében, amelyek szinte kizárólag high grade szövettani grádussal bírnak (~ 95%), a WHO 2004/2016-os osztályozási rendszer prognosztikai értéke egyértelműen korlátozott. A grade 2 tumorok esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a betegség kimenetelében a WHO 2004/2016 szerint low grade és high grade tumorok között. A grade 2 tumorok molekuláris osztályozása low grade és high grade szövettani grádusú alcsoportokba (a 17-es poliszómia és/vagy *HER2* amplifikáció hiánya vagy jelenléte alapján) azonban képes volt prognosztikai szempontból elkülöníteni őket, ami az új EAU 2004/2016-os WHO szövettani grádust használó rizikótáblával pontosabb rizikóbecslést eredményezett. Az előbbieket alapján, ha a patológus bizonytalan a WHO 2004/2016-os grádust illetően, a grade 2 tumorok ilyen jellegű molekuláris osztályozását javasoljuk, amely a vizsgálok közötti variabilitás csökkentését is elősegítheti.

Az általunk vizsgált betegcsoporton alkalmazva az AUA rizikótábla az EAU után a második legjobb teljesítményt nyújtotta, és ebben az esetben is azt találtuk, hogy pontossága tovább javítható a 17-es poliszómia/*HER2* amplifikációs státusz hozzáadásával. Az EAU- és az AUA rizikótáblákkal ellentétben az EORTC pontszámrendszerrel az alacsony és a magas kockázatú betegek differenciálása vizsgálatunkban statisztikailag nem volt szignifikáns. Ez azzal magyarázható, hogy az EORTC-pontszám kifejlesztéséhez hét tanulmányban 1979 januárja és 1989 szeptembere között randomizált betegek csoportját vizsgálták, míg ebbe a vizsgálatba évtizedekkel később diagnosztizált betegcsoport került bevonásra, amikor már fejlettebb terápiás lehetőségek álltak rendelkezésre.^{12,61,66}

Vizsgálatunkban más tanulmányokhoz képest a nem izominvazív hólyagrákok viszonylag magasabb progressziós aránya (15% vs. 4,6%-4,9%) lehetővé tette, hogy egy mindössze 90 nem izominvazív hólyagtumoros betegcsoportban értékeljük a viszonylag ritka prognosztikai eseményeket.^{163,168} Mindazonáltal a kohorsz mérete limitációt jelent, ami felelős lehet azért, hogy nem sikerült azonosítani néhány jól ismert prognosztikai tényezőt, például a tumor stádiumát vagy az EORTC pontszámot. Vizsgálatunkban magasabb a női betegek aránya (48,9%), ahogy az egy konsekutív kohorsz esetében várható lenne. A női nem prognosztikai tényező a T1 stádiumú grade 3 tumorok esetében, ez azonban valószínűleg nem befolyásolta eredményeinket, mivel több tanulmány is kimutatta, hogy a nemi hovatartozás nem prediktora a nem izominvazív hólyagrákok izominvazív betegséggé történő progressziójának.^{45,70} Tanulmányunk másik fontos értéke, hogy a *HER2*/Chr17 *in situ* hibridizáció az egyik legszélesebb körben elérhető molekuláris patológiai vizsgálat, amely nem igényel frissen fagyasztott szövetet, és ezért rutin FFPE szövettani mintákon is elvégezhető. Ebből kifolyólag a 17-es poliszómia/*HER2*-amplifikáció vizsgálat bevezetése azonnali és egyszerű megoldást jelentene a nem izominvazív húgyhólyagrákok prognosztikai rizikóbecslésének további finomítására az uroonkológiai gyakorlatban.

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy mind az általunk kifejlesztett, UroVysion teszten alapuló UroVysion FISH rizikóskála, mind a 17-es poliszómia/*HER2* amplifikációs státusz segíthet a nem izominvazív húgyhólyagrákok izominvazív tumorrá történő progressziójának előrejelzésében. A UroVysion FISH rizikóskála a hólyagrákokban jelen lévő aneuszómia fokának becslésére alkalmas, és erős

prognosztikai információt szolgáltathat vizeletből még a tumor reszekciója előtt, továbbá előre jelezheti a potenciálisan izominvazív tumorok jelenlétét. Mindemellett, a jelenlegi klinikopatológiai kockázatbecslő rendszerek kiegészítéseként az a UroVysion FISH rizikóskála javíthatja azok prognosztikai pontosságát, ebből kifolyólag további új prognosztikai eszköz lehet a hólyagrák diagnózisában és kezelésében. Eredményeink megerősítették a frissített EAU rizikótábla pontosabb kockázatbecslő képességét az eredeti változathoz képest. Továbbá a 17-es kromoszóma poliszómia/ *HER2*-amplifikációs státusz hozzáadása a frissített EAU- és AUA rizikótáblákhoz javítja azok pontosságát, és segít elkülöníteni a nem izominvazív hólyagrákok EAU magas/nagyon magas kockázatú csoportjában a progresszió szempontjából mérsékelt, illetve nagyon magas rizikójú betegeket. Az általunk vizsgált biomarkerek használata a grade 2 tumorok molekuláris osztályozásához szintén javítja az EAU rizikótábla szerinti kockázatbecslés pontosságát. Arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek a molekuláris markerek ezáltal alkalmasak a nem izominvazív hólyagrák klinikopatológiai faktorokon alapuló kockázatbecslésének pontosítására és a szövettani grade beosztásának optimalizálására, de a széles körű alkalmazáshoz további validáció szükséges független, nagyobb elemszámú betegcsoportokon. Ebből a célból javasoljuk az EAU magas/nagyon magas kockázatú (hagyományos szövettani osztályozással vagy molekulárisan támogatott osztályozással kategorizált) tumorok molekuláris alosztályozásának elvégzését *HER2*/Chr17 kettős *in situ* hibridizáció segítségével. Mivel ezt a technikát prediktív céllal régóta széles körben alkalmazzák az emlőrák patológiai diagnosztikájában, így könnyen és gyorsan adaptálható lenne a hólyagrákok prognosztikai célú vizsgálatára is. Másrészt viszonylag költségkímélő molekuláris tesztről van szó, amelynek immunhisztokémiai festési rendszerekhez igazított automatizált változata is számos patológiai osztályon elérhető napjainkban. Használata ezért költséghatékony lehet, figyelembe véve, hogy a magas és nagyon magas EAU rizikócsoportokba tartozó betegekre vonatkozó további információk segítségével egyrészt bizonyos esetekben mind a betegek, mind az egészségügyi rendszer terhei csökkenthetők, továbbá azonosíthatóak azok a potenciálisan magas rizikójú betegek, akik a megfelelő követési stratégia alkalmazásával időben jutnának hozzá a számukra szükséges kezeléshez. Eredményeink alapján további prospektív klinikai vizsgálatok tervezhetők, melyek segítségével az általunk azonosított biomarkerek a mindennapi klinikai gyakorlatba implementálhatóvá válhatnak.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A citogenetikailag abnormális sejtek százalékos aránya és az általunk kifejlesztett, UroVysion FISH rizikóskála (UFS) által jelzett citogenetikai abnormalitás szintje korrelációt mutat a nem izominvazív húgyhólyagrakok izominvazív tumorra történő progressziójával.
2. Az UFS által jelzett citogenetikai abnormalitás szintje összefüggést mutat az uroteliális karcinómák stádiumával és szövettani fokozatával.
3. A citogenetikai abnormalitás szintje prognosztikai információt nyújthat a tumor méretének, szövettani grádusának, stádiumának ismerete nélkül is, de a transzuretrális reszekció során nyert reszekátum vizsgálata során értékelt hagyományos prognosztikai faktorokhoz hozzáadva is javíthatja a prognosztikai pontosságot. Ebből kifolyólag az UFS független prognosztikai faktorként prognosztikai információkat szolgáltat a vizeletből még a tumor reszekciója előtt.
4. Az alacsony grade (G1) és a citogenetikai abnormalitás alacsony szintje (alacsony UFS) együttes fennállása nem-izominvazív (TaT1) húgyhólyagrakban a progresszió kis valószínűsége mellett magas recidíva hajlammal társul, tehát a progressziómentes kiújulás nagy valószínűségét jelzi.
5. Az UFS kombinációja a nemzetközi irányelvek által ajánlott, klinikopatológiai faktorokon alapuló rizikóbecslő táblákkal (EORTC, AUA) képes javítani azok prognosztikai pontosságát.
6. A citogenetikai abnormalitás szintjének vizsgálata vizeletmintában jelezheti a húgyhólyagrak izominvazióját, így az UFS segíthet az izominvazív tumorban szenvedő betegek azonosításában akár a transzuretrális reszekciót megelőzően.
7. A 17-es poliszómia nem izominvazív hólyagrakban magasabb szövettani grádussal és stádiummal jár együtt.
8. A 17-es kromoszóma kópiaszám-változások a jól ismert klinikai és szövettani kockázati tényezőkön túlmenően információt szolgáltatnak a nem izominvazív hólyagrakok izominvazív tumorra történő progressziójának valószínűségéről.
9. Az ASCO/CAP 2018-as irányelv szerint végzett *HER2*/Chr17 ISH alkalmazható a húgyhólyagrakok kockázatbecslésében.

10. A 17-es kromoszóma poliszómia és a *HER2*-amplifikáció egyidejű hiánya nem izominvazív húgyhólyagrakokban alacsony progressziós kockázatot jelez.
11. Függetlenül a WHO 1973 vagy 2004/2016 szövettani grade besorolási rendszer használatától, a frissített EAU rizikóbecslő rendszer pontosabb a korábban használatnál.
12. A 17-es kromoszóma kópiaszám-eltérés (poliszómia, erős poliszómia, erős poliszómiás különálló sejtpopuláció jelenléte a mintában) és a *HER2*-amplifikáció státusz hozzáadása az AUA és a frissített EAU rizikóbecslő rendszerhez (akár a WHO 1973-as, akár a 2004/2016-os szövettani grade osztályozási rendszer használata mellett) tovább javíthatja a rizikóbecslés prognosztikai pontosságát.
13. A grade 2 szövettani grádusú tumorok molekuláris osztályozása low grade és high grade szövettani grádusú alcsoportokba (a 17-es poliszómia és/vagy *HER2* amplifikáció hiánya vagy jelenléte alapján) képes prognosztikai szempontból elkülöníteni a vizsgált tumorokat, továbbá az új EAU 2004/2016-os WHO szövettani grádust használó rizikótáblával pontosabb rizikóbecslést eredményez.
14. Összefoglalva elmondható, hogy a citogenetikai abnormalitás szintjének értékelése az általunk kifejlesztett UroVysion FISH rizikóskálával és a 17-es kromoszóma poliszómia és *HER2*-amplifikáció meghatározása az ASCO/CAP 2018-as irányelv szerint a mindennapi klinikai gyakorlatba könnyen implementálható vizsgálatok, melyek az ismert konvencionális klinikopatológiai faktorokon túlmenően információt szolgáltatnak a nem izominvazív hólyagrakok izominvazív tumorrá történő progressziójának valószínűségéről.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A húgyhólyagrák világszerte a 10. leggyakoribb rosszindulatú tumor, férfiak körében a kilencedik vezető daganatos halálozási ok. Az esetek háromnegyede a diagnózis felállításakor nem izominvazív hólyagrák, azonban 10%-20%-uk potenciálisan életveszélyes izominvazív hólyagrákká alakul át a követés során. Az uroonkológia egyik legfontosabb kérdése a nem izominvazív hólyagrások izominvazív betegséggé való progressziójának előrejelzése. A nemzetközi irányelvek klinikopatológiai faktorokon alapuló rizikóbecslést javasolnak a progresszió valószínűségének meghatározására, azonban ezen rizikóskálák további pontosításra szorulnak.

Munkánk során elsődleges célunk volt fluoreszcens *in situ* hibridizációval olyan molekuláris markereket találni, melyek előre jelzik a nem izominvazív húgyhólyagrások izominvazív tumorrá történő progresszióját, és ezen felül a klinikai gyakorlatba könnyen implementálhatóak. A 17-es kromoszóma és más kromoszómák aneuszómiájának, továbbá a p53 és HER2 eltérések szerepét a hólyagrák etiopatogenezisében széles körben vizsgálták, és prognosztikai szerepük jól ismert, de gyakorlati jelentőségüket a nem izominvazív hólyagrások EAU és AUA szerinti prognosztikai osztályozásának javításában, és így az izominvazivitás előrejelzésében még nem vizsgálták. Eredményeink alapján elmondható, hogy mind az általunk kifejlesztett, UroVysion teszten alapuló UroVysion FISH rizikóskála, mind a 17-es poliszómia/HER2 amplifikációs státusz segíthet a nem izominvazív húgyhólyagrások izominvazív tumorrá történő progressziójának előrejelzésében. A UroVysion FISH rizikóskála a hólyagrásokban jelen lévő aneuszómia fokának becslésére alkalmas, és erős prognosztikai információt szolgáltat a vizeletből még a tumor reszekciója előtt, továbbá előre jelezheti a potenciálisan izominvazív tumorok jelenlétét. A 17-es kromoszóma poliszómia/HER2-amplifikációs státusz vizsgálata ASCO/CAP 2018-as irányelv szerint húgyhólyagrák szövetmintákon javítja a széles körben alkalmazott rizikótáblák pontosságát, segítségével optimalizálható a szövettani grade beosztás, továbbá segít elkülöníteni a nem izominvazív hólyagrások EAU magas/nagyon magas kockázatú csoportjában a progresszió szempontjából mérsékelt, illetve nagyon magas rizikójú betegeket. Eredményeink alapján további prospektív klinikai vizsgálatok tervezhetők, melyek segítségével az általunk azonosított biomarkerek a mindennapi klinikai gyakorlatba implementálhatóvá válhatnak.

VIII. SUMMARY

Bladder cancer is the 10th most common malignant tumour worldwide and the ninth leading cause of cancer mortality in men. Approximately 75% of cases are non-muscle invasive bladder cancer at diagnosis, but 10%-20% of them progress to potentially life-threatening muscle invasive bladder cancer during follow-up. One of the most important issues in urooncology is the prediction of progression of non-muscle invasive bladder cancer to muscle invasive disease. International guidelines recommend risk estimation based on clinicopathological factors to determine the probability of progression, but these risk stratification systems need further improvement.

Our primary aim was to find molecular markers that predict the progression of non-muscle invasive bladder cancer into muscle invasive disease by fluorescence *in situ* hybridization which can be easily implemented in the diagnostic practice. The role of aneusomy of chromosome 17 and other chromosomes, as well as p53 and HER2 abnormalities have been extensively investigated in the etiopathogenesis of bladder cancer and their prognostic role is well established, but their practical value in improving the EAU and AUA prognostic classifications of non-muscle-invasive bladder cancer and thus in predicting muscle invasiveness has yet to be explored. Our results suggest that both our UroVysion test based UroVysion FISH Score and Chromosome 17 polysomy/*HER2* amplification status can help to predict the progression of non-muscle invasive bladder cancer to muscle invasive disease. The UroVysion FISH Score can be used to estimate the degree of aneusomy present in bladder cancer and can provide strong prognostic information from voided urine before tumor resection, moreover, it can predict the presence of potentially muscle invasive tumors. Chromosome 17 polysomy/*HER2* amplification status testing in bladder cancer tissue samples according to ASCO/CAP 2018 guidelines improves the accuracy of widely used risk tables, helps to optimize histological grade assignment and can be used to select non-progressive cases by reclassifying non-*HER2*-amplified, non-polysomic NMIBCs from the high- and very high-risk groups of EAU to the intermediate-risk group. Based on our results, prospective clinical trials can be planned to implement these biomarkers into daily clinical practice.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Lenis AT, Lec PM, Chamie K, Mshs M. Bladder Cancer: A Review. *JAMA*. 2020;324(19):1980. doi:10.1001/jama.2020.17598
2. Compérat E, Amin MB, Cathomas R, et al. Current best practice for bladder cancer: a narrative review of diagnostics and treatments. *The Lancet*. 2022;400(10364):1712-1721. doi:10.1016/S0140-6736(22)01188-6
3. Seisen T, Compérat E, Léon P, Roupret M. Impact of histological variants on the outcomes of nonmuscle invasive bladder cancer after transurethral resection. *Curr Opin Urol*. 2014;24(5):524-531. doi:10.1097/MOU.0000000000000086
4. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 2005;66(6 Suppl 1):4-34. doi:10.1016/j.urology.2005.07.062
5. Compérat E, Larré S, Roupret M, et al. Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old. *Virchows Arch*. 2015;466(5):589-594. doi:10.1007/s00428-015-1739-2
6. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. *TNM Classification of Malignant Tumours*. Eighth edition. John Wiley & Sons, Inc; 2017.
7. Fritsche HM, Burger M, Svatek RS, et al. Characteristics and outcomes of patients with clinical T1 grade 3 urothelial carcinoma treated with radical cystectomy: results from an international cohort. *Eur Urol*. 2010;57(2):300-309. doi:10.1016/j.eururo.2009.09.024
8. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primer*. 2017;3:17022. doi:10.1038/nrdp.2017.22
9. van Rhijn BWG, Burger M, Lotan Y, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol*. 2009;56(3):430-442. doi:10.1016/j.eururo.2009.06.028
10. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. WHO Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 8. International Agency for Research on Cancer; 2016.
11. Colombo R, Hurle R, Moschini M, et al. Feasibility and Clinical Roles of Different Substaging Systems at First and Second Transurethral Resection in Patients with T1 High-Grade Bladder Cancer. *Eur Urol Focus*. 2018;4(1):87-93. doi:10.1016/j.euf.2016.06.004
12. Babjuk M, Burger M, Compérat EM, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. *Eur Urol*. 2019;76(5):639-657. doi:10.1016/j.eururo.2019.08.016
13. Richters A, Aben KKH, Kiemeny LALM. The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World J Urol*. 2020;38(8):1895-1904. doi:10.1007/s00345-019-02984-4

14. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol.* 2017;71(1):96-108. doi:10.1016/j.eururo.2016.06.010
15. Cumberbatch MGK, Jubber I, Black PC, et al. Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *Eur Urol.* 2018;74(6):784-795. doi:10.1016/j.eururo.2018.09.001
16. Shariat SF, Sfakianos JP, Droller MJ, Karakiewicz PI, Meryn S, Bochner BH. The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *BJU Int.* 2010;105(3):300-308. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.09076.x
17. Shariat SF, Milowsky M, Droller MJ. Bladder cancer in the elderly. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2009;27(6):653-667. doi:10.1016/j.urolonc.2009.07.020
18. van Osch FH, Jochems SH, van Schooten FJ, Bryan RT, Zeegers MP. Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies. *Int J Epidemiol.* 2016;45(3):857-870. doi:10.1093/ije/dyw044
19. Freedman ND. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. *JAMA.* 2011;306(7):737. doi:10.1001/jama.2011.1142
20. Moolgavkar SH, Stevens RG. Smoking and cancers of bladder and pancreas: risks and temporal trends. *J Natl Cancer Inst.* 1981;67(1):15-23.
21. Ng M, Freeman MK, Fleming TD, et al. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *JAMA.* 2014;311(2):183-192. doi:10.1001/jama.2013.284692
22. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-867. doi:10.1038/nature01322
23. Ishida K, Hsieh MH. Understanding Urogenital Schistosomiasis-Related Bladder Cancer: An Update. *Front Med.* 2018;5:223. doi:10.3389/fmed.2018.00223
24. Steinmaus C, Ferreccio C, Acevedo J, et al. Increased lung and bladder cancer incidence in adults after in utero and early-life arsenic exposure. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2014;23(8):1529-1538. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0059
25. Moschini M, Zaffuto E, Karakiewicz PI, et al. External Beam Radiotherapy Increases the Risk of Bladder Cancer When Compared with Radical Prostatectomy in Patients Affected by Prostate Cancer: A Population-based Analysis. *Eur Urol.* 2019;75(2):319-328. doi:10.1016/j.eururo.2018.09.034
26. Chaturvedi AK, Engels EA, Gilbert ES, et al. Second cancers among 104,760 survivors of cervical cancer: evaluation of long-term risk. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(21):1634-1643. doi:10.1093/jnci/djm201
27. Dobruch J, Daneshmand S, Fisch M, et al. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol.* 2016;69(2):300-310. doi:10.1016/j.eururo.2015.08.037

28. Martin C, Leiser CL, O'Neil B, et al. Familial Cancer Clustering in Urothelial Cancer: A Population-Based Case-Control Study. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(5):527-533. doi:10.1093/jnci/djx237
29. Carlo MI, Ravichandran V, Srinivasan P, et al. Cancer Susceptibility Mutations in Patients With Urothelial Malignancies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2020;38(5):406-414. doi:10.1200/JCO.19.01395
30. Cohen RA, Brown RS. Clinical practice. Microscopic hematuria. *N Engl J Med.* 2003;348(23):2330-2338. doi:10.1056/NEJMcp012694
31. Bruyninckx R, Buntinx F, Aertgeerts B, Van Casteren V. The diagnostic value of macroscopic haematuria for the diagnosis of urological cancer in general practice. *Br J Gen Pract J R Coll Gen Pract.* 2003;53(486):31-35.
32. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primer.* 2017;3(1):17022. doi:10.1038/nrdp.2017.22
33. Lotan Y. Promises and challenges of fluorescence cystoscopy. *Urol Oncol.* 2015;33(6):261-264. doi:10.1016/j.urolonc.2015.03.019
34. Naito S, Algaba F, Babjuk M, et al. The Clinical Research Office of the Endourological Society (CROES) Multicentre Randomised Trial of Narrow Band Imaging-Assisted Transurethral Resection of Bladder Tumour (TURBT) Versus Conventional White Light Imaging-Assisted TURBT in Primary Non-Muscle-invasive Bladder Cancer Patients: Trial Protocol and 1-year Results. *Eur Urol.* 2016;70(3):506-515. doi:10.1016/j.eururo.2016.03.053
35. Chang SS, Boorjian SA, Chou R, et al. Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline. *J Urol.* 2016;196(4):1021-1029. doi:10.1016/j.juro.2016.06.049
36. Luo C, Huang B, Wu Y, Chen J, Chen L. Use of Vesical Imaging-Reporting and Data System (VI-RADS) for detecting the muscle invasion of bladder cancer: a diagnostic meta-analysis. *Eur Radiol.* 2020;30(8):4606-4614. doi:10.1007/s00330-020-06802-z
37. Ploeg M, Aben KKH, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol.* 2009;27(3):289-293. doi:10.1007/s00345-009-0383-3
38. Campi R, Seisen T, Roupret M. Unmet Clinical Needs and Future Perspectives in Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol Focus.* 2018;4(4):472-480. doi:10.1016/j.euf.2018.08.010
39. Zamboni S, Moschini M, Simeone C, et al. Prediction tools in non-muscle invasive bladder cancer. *Transl Androl Urol.* 2019;8(1):39-45. doi:10.21037/tau.2019.01.15
40. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2016;70(1):106-119. doi:10.1016/j.eururo.2016.02.028
41. Comp erat EM, Burger M, Gontero P, et al. Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male

- Genital Organs 2016.” *Eur Urol Focus.* 2019;5(3):457-466. doi:10.1016/j.euf.2018.01.003
42. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(12):1435-1448. doi:10.1097/00000478-199812000-00001
 43. van Rhijn BWG, Hentschel AE, Bründl J, et al. Prognostic Value of the WHO1973 and WHO2004/2016 Classification Systems for Grade in Primary Ta/T1 Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Multicenter European Association of Urology Non-muscle-invasive Bladder Cancer Guidelines Panel Study. *Eur Urol Oncol.* 2021;4(2):182-191. doi:10.1016/j.euo.2020.12.002
 44. Soukup V, Čapoun O, Cohen D, et al. Prognostic Performance and Reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization Grading Classification Systems in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A European Association of Urology Non-muscle Invasive Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur Urol.* 2017;72(5):801-813. doi:10.1016/j.eururo.2017.04.015
 45. Sylvester RJ, Rodríguez O, Hernández V, et al. European Association of Urology (EAU) Prognostic Factor Risk Groups for Non–muscle-invasive Bladder Cancer (NMIBC) Incorporating the WHO 2004/2016 and WHO 1973 Classification Systems for Grade: An Update from the EAU NMIBC Guidelines Panel. *Eur Urol.* 2021;79(4):480-488. doi:10.1016/j.eururo.2020.12.033
 46. Böhle A, Jurczok A, Ardelt P, et al. Inhibition of bladder carcinoma cell adhesion by oligopeptide combinations in vitro and in vivo. *J Urol.* 2002;167(1):357-363.
 47. Brocks CP, Büttner H, Böhle A. Inhibition of tumor implantation by intravesical gemcitabine in a murine model of superficial bladder cancer. *J Urol.* 2005;174(3):1115-1118. doi:10.1097/01.ju.0000168657.51551.49
 48. Oosterlinck W, Kurth KH, Schröder F, Bultinck J, Hammond B, Sylvester R. A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1993;149(4):749-752. doi:10.1016/s0022-5347(17)36198-0
 49. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Holmang S, et al. Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur Urol.* 2016;69(2):231-244. doi:10.1016/j.eururo.2015.05.050
 50. Doherty, Trendell-Smith, Stirling, Rogers, Bellringer. Perivesical fat necrosis after adjuvant intravesical chemotherapy: PERIVESICAL FAT NECROSIS AFTER INTRAVESICAL CHEMOTHERAPY. *BJU Int.* 2001;83(4):420-423. doi:10.1046/j.1464-410x.1999.00951.x
 51. Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden APM. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1

- bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *J Urol*. 2004;171(6 Pt 1):2186-2190, quiz 2435. doi:10.1097/01.ju.0000125486.92260.b2
52. Böhle A, Jocham D, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol*. 2003;169(1):90-95. doi:10.1016/S0022-5347(05)64043-8
 53. Sylvester RJ, Brausi MA, Kirkels WJ, et al. Long-term efficacy results of EORTC genitourinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, bacillus Calmette-Guérin, and bacillus Calmette-Guérin plus isoniazid in patients with intermediate- and high-risk stage Ta T1 urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 2010;57(5):766-773. doi:10.1016/j.eururo.2009.12.024
 54. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*. 1976;116(2):180-183. doi:10.1016/s0022-5347(17)58737-6
 55. Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, et al. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. 2009;56(2):247-256. doi:10.1016/j.eururo.2009.04.038
 56. Böhle A, Bock PR. Intravesical bacille Calmette-Guérin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology*. 2004;63(4):682-686; discussion 686-687. doi:10.1016/j.urology.2003.11.049
 57. Sylvester RJ, van der MEIJDEN APM, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*. 2002;168(5):1964-1970. doi:10.1016/S0022-5347(05)64273-5
 58. Kamat AM, Sylvester RJ, Böhle A, et al. Definitions, End Points, and Clinical Trial Designs for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: Recommendations From the International Bladder Cancer Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016;34(16):1935-1944. doi:10.1200/JCO.2015.64.4070
 59. Yates DR, Brausi MA, Catto JWF, et al. Treatment options available for bacillus Calmette-Guérin failure in non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. 2012;62(6):1088-1096. doi:10.1016/j.eururo.2012.08.055
 60. Babjuk M, Burger M, Capoun O, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). *Eur Urol*. 2022;81(1):75-94. doi:10.1016/j.eururo.2021.08.010
 61. Soukup V, Čapoun O, Cohen D, et al. Risk Stratification Tools and Prognostic Models in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Critical Assessment from the European Association of Urology Non-muscle-invasive Bladder Cancer Guidelines Panel. *Eur Urol Focus*. 2020;6(3):479-489. doi:10.1016/j.euf.2018.11.005
 62. Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, et al. EORTC Nomograms and Risk Groups for Predicting Recurrence, Progression, and Disease-specific and Overall Survival in Non-Muscle-invasive Stage Ta-T1 Urothelial Bladder Cancer Patients Treated with 1-3 Years

- of Maintenance Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol.* 2016;69(1):60-69. doi:10.1016/j.eururo.2015.06.045
63. Harrell FE, Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med.* 1996;15(4):361-387. doi:10.1002/(SICI)1097-0258(19960229)15:4<361::AID-SIM168>3.0.CO;2-4
 64. Harrell FE, Lee KL, Matchar DB, Reichert TA. Regression models for prognostic prediction: advantages, problems, and suggested solutions. *Cancer Treat Rep.* 1985;69(10):1071-1077.
 65. Mallett S, Royston P, Waters R, Dutton S, Altman DG. Reporting performance of prognostic models in cancer: a review. *BMC Med.* 2010;8:21. doi:10.1186/1741-7015-8-21
 66. Sylvester RJ, van der Meijden APM, Oosterlinck W, et al. Predicting Recurrence and Progression in Individual Patients with Stage Ta T1 Bladder Cancer Using EORTC Risk Tables: A Combined Analysis of 2596 Patients from Seven EORTC Trials. *Eur Urol.* 2006;49(3):466-477. doi:10.1016/j.eururo.2005.12.031
 67. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, et al. Predicting nonmuscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guerin: the CUETO scoring model. *J Urol.* 2009;182(5):2195-2203. doi:10.1016/j.juro.2009.07.016
 68. Sylvester RJ. How well can you actually predict which non-muscle-invasive bladder cancer patients will progress? *Eur Urol.* 2011;60(3):431-433; discussion 433-434. doi:10.1016/j.eururo.2011.06.001
 69. Rieken M, Shariat SF, Kluth L, et al. Comparison of the EORTC tables and the EAU categories for risk stratification of patients with nonmuscle-invasive bladder cancer. *Urol Oncol.* 2018;36(1):8.e17-18.e24. doi:10.1016/j.urolonc.2017.08.027
 70. Palou J, Sylvester RJ, Faba OR, et al. Female Gender and Carcinoma In Situ in the Prostatic Urethra Are Prognostic Factors for Recurrence, Progression, and Disease-Specific Mortality in T1G3 Bladder Cancer Patients Treated With Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol.* 2012;62(1):118-125. doi:10.1016/j.eururo.2011.10.029
 71. Golijanin D, Yossepowitch O, Beck SD, Sogani P, Dalbagni G. Carcinoma in a bladder diverticulum: presentation and treatment outcome. *J Urol.* 2003;170(5):1761-1764. doi:10.1097/01.ju.0000091800.15071.52
 72. Bishr M, Lattouf JB, Latour M, Saad F. Tumour stage on re-staging transurethral resection predicts recurrence and progression-free survival of patients with high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Can Urol Assoc J J Assoc Urol Can.* 2014;8(5-6):E306-310. doi:10.5489/cuaj.1514
 73. Kim HS, Kim M, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Presence of lymphovascular invasion in urothelial bladder cancer specimens after transurethral resections correlates with risk of upstaging and survival: a systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol.* 2014;32(8):1191-1199. doi:10.1016/j.urolonc.2014.05.008

74. Lammers RJM, Hendriks JCM, Rodriguez Faba ORF, Witjes WPJ, Palou J, Witjes JA. Prediction model for recurrence probabilities after intravesical chemotherapy in patients with intermediate-risk non-muscle-invasive bladder cancer, including external validation. *World J Urol.* 2016;34(2):173-180. doi:10.1007/s00345-015-1598-0
75. Ritch CR, Velasquez MC, Kwon D, et al. Use and Validation of the AUA/SUO Risk Grouping for Nonmuscle Invasive Bladder Cancer in a Contemporary Cohort. *J Urol.* 2020;203(3):505-511. doi:10.1097/JU.0000000000000593
76. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(1):25-41. doi:10.1038/nrc3817
77. Kamoun A, de Reyniès A, Allory Y, et al. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2020;77(4):420-433. doi:10.1016/j.eururo.2019.09.006
78. van Rhijn BWG, Montironi R, Zwarthoff EC, Jöbsis AC, van der Kwast TH. Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma. *J Pathol.* 2002;198(2):245-251. doi:10.1002/path.1202
79. Mo L, Zheng X, Huang HY, et al. Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2007;117(2):314-325. doi:10.1172/JCI30062
80. van Oers JMM, Adam C, Denzinger S, et al. Chromosome 9 deletions are more frequent than FGFR3 mutations in flat urothelial hyperplasias of the bladder. *Int J Cancer.* 2006;119(5):1212-1215. doi:10.1002/ijc.21958
81. Chow NH, Cairns P, Eisenberger CF, et al. Papillary urothelial hyperplasia is a clonal precursor to papillary transitional cell bladder cancer. *Int J Cancer.* 2000;89(6):514-518.
82. Obermann EC, Junker K, Stoehr R, et al. Frequent genetic alterations in flat urothelial hyperplasias and concomitant papillary bladder cancer as detected by CGH, LOH, and FISH analyses. *J Pathol.* 2003;199(1):50-57. doi:10.1002/path.1259
83. Zhang ZT, Pak J, Shapiro E, Sun TT, Wu XR. Urothelium-specific expression of an oncogene in transgenic mice induced the formation of carcinoma in situ and invasive transitional cell carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59(14):3512-3517.
84. Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, et al. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev.* 2009;23(6):675-680. doi:10.1101/gad.1772909
85. Gao J, Huang HY, Pak J, et al. p53 deficiency provokes urothelial proliferation and synergizes with activated Ha-ras in promoting urothelial tumorigenesis. *Oncogene.* 2004;23(3):687-696. doi:10.1038/sj.onc.1207169
86. Casey RG, Catto JWF, Cheng L, et al. Diagnosis and management of urothelial carcinoma in situ of the lower urinary tract: a systematic review. *Eur Urol.* 2015;67(5):876-888. doi:10.1016/j.eururo.2014.10.040

87. Spruck CH, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 1994;54(3):784-788.
88. McKenney JK, Desai S, Cohen C, Amin MB. Discriminatory immunohistochemical staining of urothelial carcinoma in situ and non-neoplastic urothelium: an analysis of cytokeratin 20, p53, and CD44 antigens. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(8):1074-1078. doi:10.1097/00000478-200108000-00013
89. Jung S, Wu C, Eslami Z, et al. The role of immunohistochemistry in the diagnosis of flat urothelial lesions: a study using CK20, CK5/6, P53, Cd138, and Her2/Neu. *Ann Diagn Pathol.* 2014;18(1):27-32. doi:10.1016/j.anndiagpath.2013.10.006
90. Sfakianos JP, Lin Gellert L, Maschino A, et al. The role of PTEN tumor suppressor pathway staining in carcinoma in situ of the bladder. *Urol Oncol.* 2014;32(5):657-662. doi:10.1016/j.urolonc.2014.02.003
91. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013;500(7463):415-421. doi:10.1038/nature12477
92. Matulay JT, Kamat AM. Advances in risk stratification of bladder cancer to guide personalized medicine. *F1000Research.* 2018;7:1137. doi:10.12688/f1000research.14903.1
93. Hafner C, Knuechel R, Zanardo L, et al. Evidence for oligoclonality and tumor spread by intraluminal seeding in multifocal urothelial carcinomas of the upper and lower urinary tract. *Oncogene.* 2001;20(35):4910-4915. doi:10.1038/sj.onc.1204671
94. Cheng L, Gu J, Ulbright TM, et al. Precise microdissection of human bladder carcinomas reveals divergent tumor subclones in the same tumor. *Cancer.* 2002;94(1):104-110. doi:10.1002/cncr.10151
95. Habuchi T. Origin of multifocal carcinomas of the bladder and upper urinary tract: molecular analysis and clinical implications. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc.* 2005;12(8):709-716. doi:10.1111/j.1442-2042.2005.01155.x
96. Hafner C, Knuechel R, Stoehr R, Hartmann A. Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies. *Int J Cancer.* 2002;101(1):1-6. doi:10.1002/ijc.10544
97. Lamy P, Nordentoft I, Birkenkamp-Demtröder K, et al. Paired Exome Analysis Reveals Clonal Evolution and Potential Therapeutic Targets in Urothelial Carcinoma. *Cancer Res.* 2016;76(19):5894-5906. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0436
98. Sidransky D, Frost P, Von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger AC, Vogelstein B. Clonal origin of bladder cancer. *N Engl J Med.* 1992;326(11):737-740. doi:10.1056/NEJM199203123261104
99. Phillips JL, Richardson IC. Aneuploidy in bladder cancers: the utility of fluorescent in situ hybridization in clinical practice. *BJU Int.* 2006;98(1):33-37. doi:10.1111/j.1464-410X.2006.06189.x

100. Danielsen HE, Pradhan M, Novelli M. Revisiting tumour aneuploidy - the place of ploidy assessment in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(5):291-304. doi:10.1038/nrclinonc.2015.208
101. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396(6712):643-649. doi:10.1038/25292
102. Florl AR, Schulz WA. Chromosomal instability in bladder cancer. *Arch Toxicol*. 2008;82(3):173-182. doi:10.1007/s00204-008-0280-3
103. Davoli T, de Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:585-610. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154234
104. Oberringer M, Lothschütz D, Jennewein M, Koschnick M, Mutschler W, Hanselmann RG. Centrosome multiplication accompanies a transient clustering of polyploid cells during tissue repair. *Mol Cell Biol Res Commun MCBRC*. 1999;2(3):190-196. doi:10.1006/mcbr.1999.0172
105. Davoli T, Xu AW, Mengwasser KE, et al. Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome. *Cell*. 2013;155(4):948-962. doi:10.1016/j.cell.2013.10.011
106. King RW. When $2+2=5$: the origins and fates of aneuploid and tetraploid cells. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1786(1):4-14. doi:10.1016/j.bbcan.2008.07.007
107. Nam HJ, van Deursen JM. Cyclin B2 and p53 control proper timing of centrosome separation. *Nat Cell Biol*. 2014;16(6):538-549. doi:10.1038/ncb2952
108. de Cárcer G, Malumbres M. A centrosomal route for cancer genome instability. *Nat Cell Biol*. 2014;16(6):504-506. doi:10.1038/ncb2978
109. Janssen A, van der Burg M, Szuhai K, Kops GJPL, Medema RH. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science*. 2011;333(6051):1895-1898. doi:10.1126/science.1210214
110. Losada A. Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(6):389-393. doi:10.1038/nrc3743
111. Bakhoum SF, Swanton C. Chromosomal instability, aneuploidy, and cancer. *Front Oncol*. 2014;4:161. doi:10.3389/fonc.2014.00161
112. McGranahan N, Burrell RA, Endesfelder D, Novelli MR, Swanton C. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO Rep*. 2012;13(6):528-538. doi:10.1038/embor.2012.61
113. Morrison CD, Liu P, Woloszynska-Read A, et al. Whole-genome sequencing identifies genomic heterogeneity at a nucleotide and chromosomal level in bladder cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(6):E672-681. doi:10.1073/pnas.1313580111
114. Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol CB*. 2012;22(22):R966-980. doi:10.1016/j.cub.2012.10.006

115. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
116. Guo G, Sun X, Chen C, et al. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat Genet*. 2013;45(12):1459-1463. doi:10.1038/ng.2798
117. Ploussard G, Dubosq F, Soliman H, et al. Prognostic value of loss of heterozygosity at chromosome 9p in non-muscle-invasive bladder cancer. *Urology*. 2010;76(2):513.e13-18. doi:10.1016/j.urology.2010.03.037
118. Krüger S, Mahnken A, Kausch I, Feller AC. P16 immunoreactivity is an independent predictor of tumor progression in minimally invasive urothelial bladder carcinoma. *Eur Urol*. 2005;47(4):463-467. doi:10.1016/j.eururo.2004.12.018
119. Bartoletti R, Cai T, Nesi G, Roberta Girardi L, Baroni G, Dal Canto M. Loss of P16 expression and chromosome 9p21 LOH in predicting outcome of patients affected by superficial bladder cancer. *J Surg Res*. 2007;143(2):422-427. doi:10.1016/j.jss.2007.01.012
120. Le Frère-Belda MA, Gil Diez de Medina S, Daher A, et al. Profiles of the 2 INK4a gene products, p16 and p14ARF, in human reference urothelium and bladder carcinomas, according to pRb and p53 protein status. *Hum Pathol*. 2004;35(7):817-824. doi:10.1016/j.humpath.2004.01.019
121. Benedict WF, Lerner SP, Zhou J, Shen X, Tokunaga H, Czerniak B. Level of retinoblastoma protein expression correlates with p16 (MTS-1/INK4A/CDKN2) status in bladder cancer. *Oncogene*. 1999;18(5):1197-1203. doi:10.1038/sj.onc.1202452
122. Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J, et al. p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004;22(6):1014-1024. doi:10.1200/JCO.2004.03.118
123. Baak JPA, Bol MGW, van Diermen B, et al. DNA cytometric features in biopsies of TaT1 urothelial cell cancer predict recurrence and stage progression more accurately than stage, grade, or treatment modality. *Urology*. 2003;61(6):1266-1272. doi:10.1016/s0090-4295(03)00024-4
124. Ross JS, Cohen MB. Biomarkers for the detection of bladder cancer. *Adv Anat Pathol*. 2001;8(1):37-45. doi:10.1097/00125480-200101000-00006
125. Palmeira CA, Oliveira PA, Seixas F, Pires MA, Lopes C, Santos L. DNA image cytometry in bladder cancer: state of the art. *Anticancer Res*. 2008;28(1B):443-450.
126. Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawachi S, et al. Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006;12(9):2752-2758. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0805
127. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, et al. The Development of a Multitarget, Multicolor Fluorescence in Situ Hybridization Assay for the Detection of Urothelial Carcinoma in Urine. *J Mol Diagn*. 2000;2(3):116-123. doi:10.1016/S1525-1578(10)60625-3

128. Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, Cohen MB, Field FG, Mayall BH. Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Res.* 1991;51(14):3807-3813.
129. Li B, Kanamaru H, Noriki S, Fukuda M, Okada K. Numeric Aberration of Chromosome 17 Is Strongly Correlated with p53 Overexpression, Tumor Proliferation and Histopathology in Human Bladder Cancer. *Int J Urol.* 1998;5(4):317-323. doi:10.1111/j.1442-2042.1998.tb00358.x
130. Gallucci M, Guadagni F, Marzano R, et al. Status of the p53, p16, RB1, and HER-2 genes and chromosomes 3, 7, 9, and 17 in advanced bladder cancer: correlation with adjacent mucosa and pathological parameters. *J Clin Pathol.* 2005;58(4):367-371. doi:10.1136/jcp.2004.021154
131. Sandberg AA, Berger CS. Review of Chromosome Studies in Urological Tumors. II. Cytogenetics and Molecular Genetics of Bladder Cancer. *J Urol.* 1994;151(3):545-560. doi:10.1016/S0022-5347(17)35014-0
132. Ribal MJ, Alcaraz A, Mengual L, et al. Chromosomal High-Polysomies Predict Tumour Progression in T1 Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol.* 2004;45(5):593-599. doi:10.1016/j.eururo.2003.12.013
133. Bollmann M, Heller H, Bánkfalvi A, Griefingholt H, Bollmann R. Quantitative molecular urinary cytology by fluorescence in situ hybridization: a tool for tailoring surveillance of patients with superficial bladder cancer? *BJU Int.* 2005;95(9):1219-1225. doi:10.1111/j.1464-410X.2005.05509.x
134. Petrov SV, Malkhasyan KA, Ulyanin MY, Abdrakhmanov EF, Khasanov RS. The value of the preoperative FISH test in unscreened bladder cancer patients with TUR indications. *Pathol Oncol Res POR.* 2012;18(4):1059-1066. doi:10.1007/s12253-012-9544-6
135. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2007;26(1):118-145. doi:10.1200/JCO.2006.09.2775
136. Ding W, Tong S, Gou Y, et al. Human epidermal growth factor receptor 2: a significant indicator for predicting progression in non-muscle-invasive bladder cancer especially in high-risk groups. *World J Urol.* 2015;33(12):1951-1957. doi:10.1007/s00345-015-1557-9
137. Abdelrahman AE, Rashed HE, Elkady E, Elsebai EA, El-Azony A, Matar I. Fatty acid synthase, Her2/neu, and E2F1 as prognostic markers of progression in non-muscle invasive bladder cancer. *Ann Diagn Pathol.* 2019;39:42-52. doi:10.1016/j.anndiagpath.2019.01.002
138. Sanguedolce F, Cormio A, Massenio P, et al. Altered expression of HER-2 and the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 predicts the outcome of T1 high-grade bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018;144(4):637-644. doi:10.1007/s00432-018-2593-9
139. Chen PCH, Yu HJ, Chang YH, Pan CC. Her2 amplification distinguishes a subset of non-muscle-invasive bladder cancers with a high risk of progression. *J Clin Pathol.* 2013;66(2):113-119. doi:10.1136/jclinpath-2012-200944

140. Ohta JI, Miyoshi Y, Uemura H, et al. Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-erbB-2 gene amplification and chromosomal anomalies in bladder cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2001;7(8):2463-2467.
141. Merola R, Mottolese M, Orlandi G, et al. Analysis of aneusomy level and HER-2 gene copy number and their effect on amplification rate in breast cancer specimens read as 2+ in immunohistochemical analysis. *Eur J Cancer.* 2006;42(10):1501-1506. doi:10.1016/j.ejca.2006.03.011
142. Vodicka P, Andera L, Opattova A, Vodickova L. The Interactions of DNA Repair, Telomere Homeostasis, and p53 Mutational Status in Solid Cancers: Risk, Prognosis, and Prediction. *Cancers.* 2021;13(3):479. doi:10.3390/cancers13030479
143. Hodgson A, van Rhijn BWG, Kim SS, et al. Reassessment of p53 immunohistochemistry thresholds in invasive high grade bladder cancer shows a better correlation with TP53 and FGFR3 mutations. *Pathol Res Pract.* 2020;216(11):153186. doi:10.1016/j.prp.2020.153186
144. Hodgson A, Xu B, Downes MR. p53 immunohistochemistry in high-grade urothelial carcinoma of the bladder is prognostically significant. *Histopathology.* 2017;71(2):296-304. doi:10.1111/his.13225
145. Babjuk M, Burger M, Compérat EM, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. *Eur Urol.* 2019;76(5):639-657. doi:10.1016/j.eururo.2019.08.016
146. Kocsmár I, Pajor G, Gyöngyösi B, et al. Development and Initial Testing of a Modified UroVysion-Based Fluorescence In Situ Hybridization Score for Prediction of Progression in Bladder Cancer. *Am J Clin Pathol.* 2020;153(2):274-284. doi:10.1093/ajcp/aqz165
147. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. 2018 Accessed March 11 2020.
148. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(11):1364-1382. doi:10.5858/arpa.2018-0902-SA
149. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005;11(12):4393-4399. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2256
150. Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G, et al. Addition of Chromosome 17 Polysomy and HER2 Amplification Status Improves the Accuracy of Clinicopathological Factor-Based Progression Risk Stratification and Tumor Grading of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cancers.* 2022;14(19):4570. doi:10.3390/cancers14194570
151. Lafortune G. *Health at a Glance 2007: OECD Indicators.* OECD Publishing; 2007.
152. Lobo N, Hensley PJ, Bree KK, et al. Updated European Association of Urology (EAU) Prognostic Factor Risk Groups Overestimate the Risk of Progression in Patients with Non-muscle-invasive Bladder Cancer Treated with Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol Oncol.* 2022;5(1):84-91. doi:10.1016/j.euo.2021.11.006

153. Riesz P, Lotz G, Páska C, et al. Detection of bladder cancer from the urine using fluorescence in situ hybridization technique. *Pathol Oncol Res POR*. 2007;13(3):187-194. doi:10.1007/BF02893498
154. Pajor G, Somogyi L, Melegh B, et al. Urovysion: Considerations on modifying current evaluation scheme, including immunophenotypic targeting and locally set, statistically derived diagnostic criteria. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2011;79(5):375-382. doi:10.1002/cyto.a.21065
155. Kipp BR, Tanasescu M, Else TA, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization and its ability to predict bladder cancer recurrence and progression to muscle-invasive bladder cancer. *J Mol Diagn JMD*. 2009;11(2):148-154. doi:10.2353/jmoldx.2009.080096
156. Pajor G, Alpar D, Kajtar B, et al. Automated signal pattern evaluation of a bladder cancer specific multiprobe-fish assay applying a user-trainable workstation. *Microsc Res Tech*. 2012;75(6):814-820. doi:10.1002/jemt.21131
157. Huysentruyt CJR, Baldewijns MM, Rüland AM, et al. Modified UroVysion scoring criteria increase the urothelial carcinoma detection rate in cases of equivocal urinary cytology. *Histopathology*. 2011;58(7):1048-1053. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.03859.x
158. Lin T, Liu Z, Liu L, et al. Prospective evaluation of fluorescence in situ hybridization for diagnosing urothelial carcinoma. *Oncol Lett*. 2017;13(5):3928-3934. doi:10.3892/ol.2017.5926
159. Mischinger J, Guttenberg LP, Hennenlotter J, et al. Comparison of different concepts for interpretation of chromosomal aberrations in urothelial cells detected by fluorescence in situ hybridization. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143(4):677-685. doi:10.1007/s00432-016-2310-5
160. Matsuyama H, Ikemoto K, Eguchi S, et al. Copy number aberrations using multicolour fluorescence in situ hybridization (FISH) for prognostication in non-muscle-invasive bladder cancer (NIMBC). *BJU Int*. 2014;113(4):662-667. doi:10.1111/bju.12232
161. Zellweger T, Benz G, Cathomas G, et al. Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. *Int J Cancer*. 2006;119(7):1660-1665. doi:10.1002/ijc.21704
162. Kang HW, Seo SP, Jeong P, et al. Long-term validation of a molecular progression-associated gene classifier for prediction of muscle invasion in primary non-muscle-invasive bladder cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(2):2468-2474. doi:10.3892/ol.2017.6408
163. van Kessel KEM, van der Keur KA, Dyrskjøt L, et al. Molecular Markers Increase Precision of the European Association of Urology Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Progression Risk Groups. *Clin Cancer Res*. 2018;24(7):1586-1593. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2719
164. Lodde M, Mian C, Mayr R, et al. Recurrence and progression in patients with non-muscle invasive bladder cancer: prognostic models including multicolor fluorescence in situ hybridization molecular grading. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc*. 2014;21(10):968-972. doi:10.1111/iju.12509

165. Sauter G, Moch H, Gasser TC, Mihatsch MJ, Waldman FM. Heterogeneity of chromosome 17 and erbB-2 gene copy number in primary and metastatic bladder cancer. *Cytometry*. 1995;21(1):40-46. doi:10.1002/cyto.990210109
166. Mohanty SK, Mishra SK, Tiwari A, et al. Reappraisal of *HER2* Amplification in High-Grade Urothelial Carcinoma Based on 2018 ASCO/CAP Clinical Practice Guidelines. *Am J Clin Pathol*. Published online June 14, 2021:aqab083. doi:10.1093/ajcp/aqab083
167. Soukup V, Čapoun O, Cohen D, et al. Prognostic Performance and Reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization Grading Classification Systems in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A European Association of Urology Non-muscle Invasive Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur Urol*. 2017;72(5):801-813. doi:10.1016/j.eururo.2017.04.015
168. Dyrskjøt L, Reinert T, Algaba F, et al. Prognostic Impact of a 12-gene Progression Score in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Prospective Multicentre Validation Study. *Eur Urol*. 2017;72(3):461-469. doi:10.1016/j.eururo.2017.05.040

X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Kocsmár I, Pajor G, Gyöngyösi B, Székely E, Varga M, Kocsmár É, Kenessey I, Beöthe T, Süle N, Majoros A, Szendrői A, Nyírády P, Kiss A, Riesz P, Lotz G.

Development and Initial Testing of a Modified UroVysion-Based Fluorescence In Situ Hybridization Score for Prediction of Progression in Bladder Cancer.

Am J Clin Pathol. 2020 Jan 2;153(2):274-284.

doi: 10.1093/ajcp/aqz165; PMID: 31732739

Impakt faktor: 2,493

Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor G, Kulka J, Székely E, Kristiansen G, Schilling O, Nyírády P, Kiss A, Schaff Z, Riesz P, Lotz G.

Addition of Chromosome 17 Polysomy and HER2 Amplification Status Improves the Accuracy of Clinicopathological Factor-Based Progression Risk Stratification and Tumor Grading of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer.

Cancers (Basel). 2022 Sep 21;14(19):4570.

doi: 10.3390/cancers14194570; PMID: 36230493; PMCID: PMC9558547.

Impakt faktor: 5,2

Az értekezés témájától független közlemények:

Károlyi M, Kolossváry M, Bartykowszki A, Kocsmár I, Szilveszter B, Karády J, Merkely B, Maurovich-Horvat P.

Quantitative CT assessment identifies more heart transplanted patients with progressive coronary wall thickening than standard clinical read.

J Cardiovasc Comput Tomogr. 2019 Mar-Apr;13(2):128-133. Epub 2018 Nov 19.

doi:10.1016/j.jcct.2018.11.006; PMID: 30528167.

Impakt faktor: 2,892

Lotz G, Smuk G, Kocsmár É, Kocsmár I, Tímár J.

Predictive Diagnostics of the Programmed Cell Death Receptor 1 (PD-1) - Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Inhibitory Therapies.

Magy Onkol. 2019 Sep 18;63(3):183-191. Epub 2019 Aug 30.

PMID: 31533137

Kocsmár É, Kocsmár I, Karczub J, Istók R, Kiss A, Schaff Z, Lotz G.

Clinicopathological Characterization and Autopsybased Classification of the Cancer of Unknown Primary Origin (CUP) Syndrome.

Magy Onkol. 2019 Jun 21;63(2):75-84. Epub 2019 Apr 7.

PMID: 31225530

Kovács PT, Juhász D, Módos O, Kocsmár I, Terebessy A, Lotz G, Szarvas T, Nyirády P, Riesz P.

Characteristics of bladder recurrence after radical nephroureterectomy in upper urinary tract cancer.

Orv Hetil. 2020 May;161(21):881-888.

doi: 10.1556/650.2020.31709; PMID: 32427573.

Impakt faktor: 0,540

Smuk G, Pajor G, Szuhai K, Morreau H, Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor L, Kajtár B, Sárosi V, Lotz G, Tornóczky T.

Attenuated Isolated 3' Signal: A Highly Challenging Therapy Relevant ALK FISH Pattern in NSCLC.

Lung Cancer. 2020 May;143:80-85. Epub 2020 Mar 10.

doi: 10.1016/j.lungcan.2020.03.007; PMID: 32272316

Impakt faktor: 5,705

Kocsmár É, Kocsmár I, Szalai L, Lendvai G, Sziártó A, Schaff Z, Kiss A, Kovalszky I, Papp G, Lotz G.

Cross-testing of major molecular markers indicates distinct pathways of tumorigenesis in gastric adenocarcinomas and synchronous gastrointestinal stromal tumors.

Sci Rep. 2020 Dec 17;10(1):22212.

doi: 10.1038/s41598-020-78232-2; PMID: 33335133

Impakt faktor: 4,380

Kocsmár É, Kocsmár I, Buzás GM, Szirtes I, Wacha J, Takáts A, Hritz I, Schaff Z, Rugge M, Fassan M, Kiss A, Lotz G.

Helicobacter pylori heteroresistance to clarithromycin in adults-New data by in situ detection and improved concept.

Helicobacter. 2020 Feb;25(1):e12670. Epub 2019 Nov 8.

doi: 10.1111/hel.12670; PMID: 31701608.

Impakt faktor: 5,753

Talla SB, Rempel E, Endris V, Jenzer M, Allgäuer M, Schwab C, Kazdal D, Stögbauer F, Volckmar AL, Kocsmár I, Neumann O, Schirmacher P, Zschäbitz S, Duensing S, Budczies J, Stenzinger A, Kirchner M.

Immuno-oncology gene expression profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded clear cell renal cell carcinoma: Performance comparison of the NanoString nCounter technology with targeted RNA sequencing.

Genes Chromosomes Cancer. 2020 Jul;59(7):406-416.

doi: 10.1002/gcc.22843; PMID: 32212351.

Impakt faktor: 5,006

Lotz G, Kocsmár I, Tímár J.

Molecular classification of bladder cancer in 2021.

Magy Onkol. 2021 Dec 7;65(4):301-306. Epub 2021 Oct 20.

PMID: 34874360.

Kocsmár É, Buzás GM, Szirtes I, Kocsmár I, Kramer Z, Szijártó A, Fadgyas-Freyler P, Szénás K, Ruggé M, Fassan M, Kiss A, Schaff Z, Röst G, Lotz G.

Primary and secondary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and mathematical modeling of the role of macrolides.

Nat Commun. 2021 Apr 15;12(1):2255.

doi: 10.1038/s41467-021-22557-7; PMID: 33859206

Impakt faktor: 17,694

Jewel Ju Ea Kim, Ildikó Kocsmár, György Miklós Buzás, Ildikó Szirtes, Orsolya Rusz, Csaba Diczházi, Attila Szijártó, István Hritz, Zsuzsa Schaff, András Kiss, Éva Kocsmár*, Gábor Lotz*

Efficacy of Clarithromycin Depends on the Bacterial Density in Clarithromycin-Heteroresistant *Helicobacter pylori* Infections: An In Situ Detected Susceptibility and Quantitative Morphometry-Based Retrospective Study.

Pathol Oncol Res. 2021 Jun 29;27:1609863.

doi: 10.3389/pore.2021.1609863; PMID: 34267605

Impakt faktor: 2,874

Szalai L, Jakab Á, Kocsmár I, Szirtes I, Kenessey I, Szijártó A, Schaff Z, Kiss A, Lotz G, Kocsmár É.

Prognostic Ability of Tumor Budding Outperforms Poorly Differentiated Clusters in Gastric Cancer.

Cancers (Basel). 2022 Sep 28;14(19):4731.

doi: 10.3390/cancers14194731; PMID: 36230653

Impakt faktor: 5,2

Tolkach Y, Kremer A, Lotz G, Schmid M, Mayr T, Förster S, Garbe S, Hosni S, Cronauer MV, Kocsmár I, Kocsmár É, Riesz P, Alajati A, Ritter M, Ellinger J, Ohlmann CH, Kristiansen G.

Androgen Receptor Splice Variants Contribute to the Upregulation of DNA Repair in Prostate Cancer.

Cancers (Basel). 2022 Sep 13;14(18):4441.

doi: 10.3390/cancers14184441; PMID: 36139600

Impakt faktor: 5,2

Kocsmár É, Schmid M, Cosenza-Contreras M, Kocsmár I, Föll M, Krey L, Barta BA, Rác G, Kiss A, Werner M, Schilling O, Lotz G, Bronsert P.

Proteome alterations in human autopsy tissues in relation to time after death.

Cell Mol Life Sci. 2023 Apr 5;80(5):117.

doi: 10.1007/s00018-023-04754-3; PMID: 37020120

Impakt faktor: 8,0*

*Várható IF érték

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Mindazoknak, akik a tudományos munkámban és az értekezés elkészítésében segítségemre voltak.

Elsőként köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Lotz Gábornak**, aki egyetemi hallgatói éveim és doktori tanulmányaim alatt a közös kutatómunkánk során mindvégig támogatott. Kiváló meglátásaival és szakértő kritikáival nyújtott segítsége mellett számos lehetőséget adott a munkám bemutatására és a tudományos életben való érvényesülésre.

Köszönetemet fejezem ki **Prof. Dr. Tímár József** és **Prof. Dr. Kiss András** Igazgató Uraknak, hogy a II. Sz. Patológiai Intézet volt és jelenlegi vezetőiként lehetőséget biztosítottak számomra az Intézetben a kutatómunkám elvégzésére és figyelemmel kísérték azt.

Külön köszönetemet fejezem ki **Prof. Dr. Nyirády Péternek** Igazgató Úrnak, hogy az Urológiai Klinika vezetőjeként támogatott kutatómunkám elvégzésében és disszertációm elkészítésében.

Szeretném kiemelten megköszönni a szakmai támogatását és tanácsait **Prof. Dr. Schaff Zsuzsának**.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Riesz Péternek** a közös munkáért. Tőle mindig kérdezhettem, szakértelme nagy segítség volt számomra az évek során.

Szeretnék köszönetet mondani a szakmai támogatásáért és a közös munkáért **Prof. Dr. Kulka Janinának, Dr. Székely Eszternek, Dr. Pajor Gábornak** és **Dr. Tőkés Anna-Máriának**.

Külön köszönet illeti a testvéremet, **Dr. Kocs Márk Évát**, akivel tudományos diákkörös éveink óta igazi csapatként dolgoztunk együtt, támogatása és éles meglátásai nélkül nem jöhettek volna létre azok a tanulmányok, amelyekre most büszke lehetek.

Szeretném megköszönni **Dr. Gyöngyösi Benedeknek** az értekezés házi bírálatában végzett alapos munkáját és a biztató szavait.

Köszönet illeti még az immunhisztokémiai és FISH vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségéért **Horváth Csillát, Pekár Zoltánné Magdát, Dr. Sklánitzné Samodai Erikát** és **Kovács Erzsébetet**.

Örökké hálás leszek a **Szüleimnek** a töretlen támogatásukért a tanulmányaimban és a céljaim elérésében. Köszönet illeti még a **Barátaimat** a támogatásukért és a türelmükért.